

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Angefertigt in Regensburg, Universitätsklinikum Regensburg

(Mentor: Prof. Dr. Peter Hau)

**Stereotaktische Implantation und immunhistologische Färbung von
physiologischen und pathologischen Vorläuferzellen aus dem humanen
zentralen Nervensystem**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Maike Rüttgers
aus Aachen

München 2015

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 31.Januar 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Maligne Gliome.....	1
1.1.1	Nomenklatur.....	1
1.1.2	Klassifizierung und Graduierung	2
1.1.3	Histologie und Immunhistologie des GBM	7
1.1.4	Diagnostik, Therapieversagen und Prognose des GBM.....	9
1.2	Tumorstammzellhypothese	11
1.3	Mausmodell	15
1.3.1	GBM-Nacktmausmodell	15
1.3.2	Prinzip des Modells.....	16
1.4	Intrakranielle Tumore in der Tiermedizin.....	17
1.5	Ziel der Dissertation	19
2	Material	21
2.1	Medien und Zusätze	21
2.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.3	Antikörper	24
2.4	Puffer und Lösungen	25
2.5	Sedation.....	25
2.6	Geräteliste.....	26
2.7	Probenmaterial	26
2.7.1	Humane GBM Zelllinien.....	27
2.7.2	Hirntumor initiiierende Zellen und Tumor Zellen	27
2.7.3	Humane neuronale Vorläuferzellen	27
2.8	Mausmodell.....	28
2.8.1	Tierhaltung	29
3	Methoden.....	30
3.1	Zellkultur	30
3.1.1	Zellzahlbestimmung	31
3.1.2	Vorbereitung der Zellsuspension präoperativ	31
3.2	Vorversuch	32

3.3	Versuchsplan und Endpunkte	33
3.3.1	Biometrische Planung	34
3.3.2	Festlegung der End- beziehungsweise Abbruchpunkte	34
3.4	In <i>vivo</i> Methoden.....	36
3.4.1	Stereotaktische Implantation	36
3.4.2	Magnetresonanztomographie (MRT)	41
3.4.3	Kardiale Perfusion	44
3.5	Aufarbeitung des Gewebes.....	49
3.5.1	Kryokonservierung, Einfrieren nach Johnson	49
3.5.2	Gefrierschnitte	49
3.5.3	Färbungen.....	50
4	Ergebnisse	54
4.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	54
4.2	Ergebnisse der Hauptversuche	55
4.3	Bildgebende Verfahren (MRT)	56
4.3.1	Vorversuche	57
4.3.2	Hirntumor initiiierende Zellen und Tumorzellen	59
4.4	Histologie	65
4.4.1	Vorversuche	66
4.4.2	Hirntumor initiiierende Zellen.....	68
4.4.3	Tumorzellen	72
4.5	Vergleich der Tumordetektion - Histologie und MRT.....	74
4.6	Immunhistologie.....	75
4.6.1	Vorversuche	76
4.6.2	Hirntumor initiiierende Zellen.....	78
5	Diskussion	81
5.1	Versuchsaufbau und Tumorinduktion.....	81
5.1.1	Zellauswahl der Vorversuche.....	83
5.1.2	Zellauswahl und Endpunkte der Hauptversuche.....	84
5.1.3	Biometrische Planung	84

5.1.4	Abbruchkriterien	85
5.1.5	Injektionsvolumen	86
5.1.6	Mausmodell	87
5.1.7	Stereotaktische Implantation	89
5.1.8	MRT	91
5.1.9	Aufarbeitung des Gewebes.....	94
5.2	Korrelation der Ergebnisse zum Gesamtprojekt	101
6	Zusammenfassung	104
7	Summary	105
8	Ausblick	107
9	Anhang	108
9.1	Biometrische Planung: Hirntumor initiiierende Zellen und Tumor Zellen	108
9.2	Einzeldaten der Versuchstiere - Gewichtsverlauf	109
10	Verzeichnisse	122
10.1	Literaturverzeichnis.....	122
10.2	Abkürzungsverzeichnis	133
10.3	Tabellenverzeichnis.....	135
10.4	Abbildungsverzeichnis	137
	Danksagung	140

1 Einleitung

1.1 Maligne Gliome

So dass Gehirntumore zählen mit schätzungsweise 2% aller Tumorerkrankungen, einer jährlichen Inzidenz von fünf neuen Fällen pro 100.000 Personen weltweit und der überwiegend schlechten Prognose zu einer der bedeutendsten Tumorformen beim Menschen (Feltbower, 2004) (Wen, 2008).

Sie zeichnen sich als eine der Haupttodesursachen bei älteren Personen mit Krebserkrankungen aus (Jacques, 2013) (www.cbtrus.org). Die Gruppe der Gliome stellt dabei die größte Gruppe von Hirntumoren dar und weist sehr unterschiedliche histologische Bilder und Malignitätskriterien auf (Jacques, 2013). Unter allen Gliomen finden sich 60-70% Glioblastome, sie sind die zahlreichsten malignen Hirntumore des Erwachsenen. Jährlich werden 2000-3000 Neuerkrankungen alleine in Deutschland diagnostiziert, 50% der Patienten versterben innerhalb des ersten Jahres (Weller, 2009).

Aufgrund der leider bisher nur sehr begrenzten Erfolge der zurzeit üblichen Kombinationstherapie, bestehend aus Resektion, anschließender Bestrahlung und oraler Medikation, ist die Erforschung und Umsetzung neuer Therapieansätze daher von besonderer Bedeutung.

1.1.1 Nomenklatur

Eine weltweit einheitliche Klassifizierung und Nomenklatur der Tumore stellt sowohl eine wichtige Grundlage für die richtige Wahl der Therapie, als auch für die Durchführung und den Vergleich klinischer Studien dar (Kleihues, 2007). Seit 1956 gilt weltweit als anerkannte Leitlinie zur Einteilung der Tumore die von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation: WHO) erstellte Klassifizierung, welche nach den aktuellen Erkenntnissen der Forschung regelmäßig angepasst wird. Diese Einteilung der Tumore ist medizinisch von großer Wichtigkeit und wird von Onkologen seit dem 19. Jahrhundert immer weiter spezifiziert.

Erstmals wurde der Begriff „Gliom“ Mitte des 19. Jahrhunderts in „Die krankhaften Geschwülste“ von Rudolph Virchow aufgeführt. Hierbei

beschreibt er das Gliom als „partielle Hypertrophie der Gliazellen“ (Virchow, 1863).

Gliazellen sind Zellen, die sich strukturell von den Neuronen abgrenzen und als eine Art funktionelles Interstitium fungieren. Je nach Aufgabe lassen sich diese weiter in Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Ependymzellen differenzieren. Astrozyten übernehmen Stütz-, Halte- und Ernährungsfunktion, Mikroglia fungieren als ortsständige Makrophagen, Oligodendrozyten bilden die Markscheiden, und Ependymzellen kleiden die Ventrikel und den Zentralnervengang aus. Anhand dieser Differenzierung der Gliazellen kann man heute die Gliome noch genauer klassifizieren.

1.1.2 Klassifizierung und Graduierung

Auf der Basis von histologischen Untersuchungen werden Hirntumore von der WHO anhand ihrer histopathologischen Entdifferenzierung in vier verschiedene Gruppen eingeteilt. Dabei entscheiden die Malignitätsmerkmale wie Morphologie, genetische Kriterien, mitotische Aktivität, invasives Wachstum, Gewebnekrosen und die mikrovaskuläre Proliferation über die Graduierung des jeweiligen Tumors (Feiden, 2008).

Neben den histopathologischen Basisfärbungen, dem Hämalaun-Eosin, leistet inzwischen auch die Immunhistochemie (IHC) einen wesentlichen Beitrag zur Differenzierung und Einteilung der Tumore nach ihren verschiedenen Malignitätskriterien.

Bei WHO Grad-I Tumoren handelt es sich um benigne, gut abgrenzbare Tumore mit geringer Mitoserate, die gut durch chirurgische Resektion heilbar sind. WHO Grad-II Tumore zeichnen sich durch ein langsames Wachstum, jedoch eine hohe Rezidivrate aus. Die mediane Überlebenszeit liegt dabei bei über 5 Jahren. WHO Grad-III Tumore zeigen deutliche Malignitätskriterien mit erhöhter Proliferationsrate und pleomorphen Zellkernen. Grad-IV bildet die Gruppe der hochmalignen Tumore wie dem Glioblastoma multiforme (GBM). Kennzeichen ist eine sehr hohe Mitoserate, ein hoher Zellgehalt, atypische Zellen, wenig Apoptose (programmierter Zelltod) und deutliche Angiogenese (Gefäßbildung). Die meisten Patienten erliegen ca.

14 Monate nach Diagnosestellung eines Grad-IV Tumors der Erkrankung (Stupp, 2005). Die Prognose ist allerdings stark von der jeweiligen Tumorform abhängig. Gliome der Grad-IV Gruppe besitzen die schlechteste Prognose (Kleihues, 2007; Tonn, 2007; Feiden, 2008).

Zur Abgrenzung zwischen Grad III und IV spielen vor allem die Malignitätskriterien wie Vaskularisierung, Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS), Nekrosen und Invasivität eine Rolle (Kleihues, 2007).

1.1.2.1 Primäres und sekundäres GBM

Eine Untergruppe des Glioms ist das Glioblastoma multiforme (GBM). Der Name leitet sich dabei von der Schnittfläche des GBM ab, bei der makroskopisch ein „vielförmiges“ Bild durch vitale Zellen, Einblutungen, nekrotischen Arealen und zystischen Bereichen sichtbar wird. In der Untergruppe der Glioblastome werden primäres und sekundäres GBM unterschieden.

Das primäre GBM tritt vor allem bei älteren Patienten, durchschnittlich im Alter von 53 Jahren, auf und zeichnet sich durch eine - trotz intensiver Forschung - immer noch sehr schlechte Prognose und durch ein schnelles Wachstum aus. Es entsteht direkt aus hirneigenen Zellen nach maligner Transformation aus Gliazellen oder aus neuronalen Vorläuferzellen nach einer kleinen malignen Läsion, vor allem im Bereich der Großhirnhemisphären und den Balken (Hadjipanayis, 2009) (Vescovi, 2006). Primäre GBM sind gekennzeichnet durch ein invasives Wachstum und breiten sich vornehmlich entlang der großen Faserbündel aus. Trotz der Ausbreitung gibt es keine Gefäßeinbrüche und folglich keine Metastasierung in andere Organe. Dennoch sind 7-8% der Gliome multifokal, entstanden durch die Migration von einzelnen Zellen aus dem Randbereich (Weller, 2009).

Sekundäre Glioblastome findet man insbesondere bei jüngeren Patienten. Diese entwickeln sich über diffuse Astrozytome (WHO Grad II), Oligoastrozyten (WHO Grad II) und Oligodendrogliomen (WHO Grad II) zu anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III), anaplastischen Oligoastrozytomen (WHO Grad III) oder anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO Grad III) bis zu dem sekundären GBM (WHO Grad IV) und sind gekennzeichnet durch ein deutlich langsames Wachstum im Vergleich

zum primären GBM (Louis, 2007; Ohgaki, 2009; Riemenschneider, 2010), (Abbildung). Durch das langsame Wachstum und die Transformation eines eher niedrig malignen Tumors werden die sekundären GBM allerdings oft vor ihrer Höhergraduierung erkannt (Ohgaki, 2009)

1.1.2.2 Genetik des GBM

Beide GBM Formen können nicht ausschließlich anhand ihrer histologischen Merkmale differenziert, sondern müssen über charakteristische, genetische Muster unterschieden werden. So kommen beim primären GBM bei 40% eine EGFR Amplifikation, eine PTEN und p16 Deletion vor, die beim sekundären GBM jedoch nur sehr selten gefunden wird (Watanabe, 1996; Reis, 2000; Ohgaki, 2009; Ohgaki, 2004).

In den letzten Jahren steigt die Bedeutung der molekularen Untersuchungen als Basis einer sogenannten „*targeted therapy*“ immer mehr an. Hier wird versucht, nach erfolgreicher Identifizierung von molekularen Besonderheiten eine zielgerichtete Tumorthherapie zu gestalten, zum Beispiel bei dem Nachweis der Hypermethylierung des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Gen-Promotors (MGMT-Promoter) in malignen Gliomen. Hier zeigt sich ein besonders gutes Ansprechen auf die kombinierten Behandlungen aus Bestrahlung und alkylierender Chemotherapie, beispielsweise mit Temozolomid (Hegi, 2005). Auf Basis dieser neuesten Erkenntnisse kann anhand des jeweiligen Mutationsspektrums zusätzlich zu der WHO Klassifizierung noch eine Subklassifizierung des primären Glioblastoma multiforme (GBM) erfolgen. Diese wird so schon zu Teilen für die zielgerichtete Therapie des GBM genutzt und soll in Zukunft zu einer immer besser angepassten, individuellen Therapie verhelfen.

Im „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) Research Network 2008 wurde von 91 Patienten und 601 Genen ein Mutationsspektrum des GBM erstellt. Auf der Basis des veränderten genetischen Profils entwickelte Verhaak et al eine weitere Einteilung in die vier Subtypen des GBM (Verhaak, 2010). Die Subtypen weisen dabei eine vergleichbare Signatur auf, dabei wurden diese mit Daten von Cahoy et al 2008 verglichen.

Man unterscheidet die Subtypen klassisch, mesenchymal, proneural und neural. Bei allen konnten Mutationen im TP53 (Tumorprotein 53), RB (Retinoblastom-Protein) und verschiedenen Teilen des RTK (Rezeptor Tyrosine Kinase) Stoffwechselweg nachgewiesen werden. Daher wird davon ausgegangen, dass diese die zentralen Punkte der Pathogenese des GBM beinhalten. Alle Subtypen weisen dabei außerdem eine Amplifikation im Chromosom 7 bei der Kodierung von EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) auf, ein Apoptose reduzierender und Zellwachstum stimulierender Rezeptor, und eine Deletion auf Chromosom 10 bei der PTEN Kodierung, die je nach Subtyp unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Das klassische GBM zeigt vor allem einen vierfachen Anstieg des EGFR in Kombination mit einer deutlichen Reduktion der TP53 Mutationen (Verhaak, 2010).

Bei dem mesenchymalen Subtyp tritt überwiegend eine hemizygote Löschung der 17q11.2 Region auf. Dies betrifft hauptsächlich das Gen NF1 (Neurofibromin 1), zuständig für die Kodierung von Neurofilamenten und damit wichtig für das kontrollierte Zellwachstum.

Das proneurale GBM, auch bezeichnet als atypisches GBM, zeigt vor allem eine Punktmutation in IDH 1 (Isocitratdehydrogenase 1) sowie bei einem Hauptteil eine direkte Mutation von TP 53 (Van Meir, 2010) (Verhaak, 2010).

Bei dem neuralen GBM findet neben einer EGFR Überexpression eine hauptsächlich Typisierung über das Expressionsmuster statt (Van Meir, 2010). In dieser Gruppe findet sich die größte Ähnlichkeit zu physiologischen Hirngewebe mit einer gemischten Gensignatur von neuronalen, astrozytären und oligodendrozytären Zellen (Verhaak, 2010) (Abbildung).

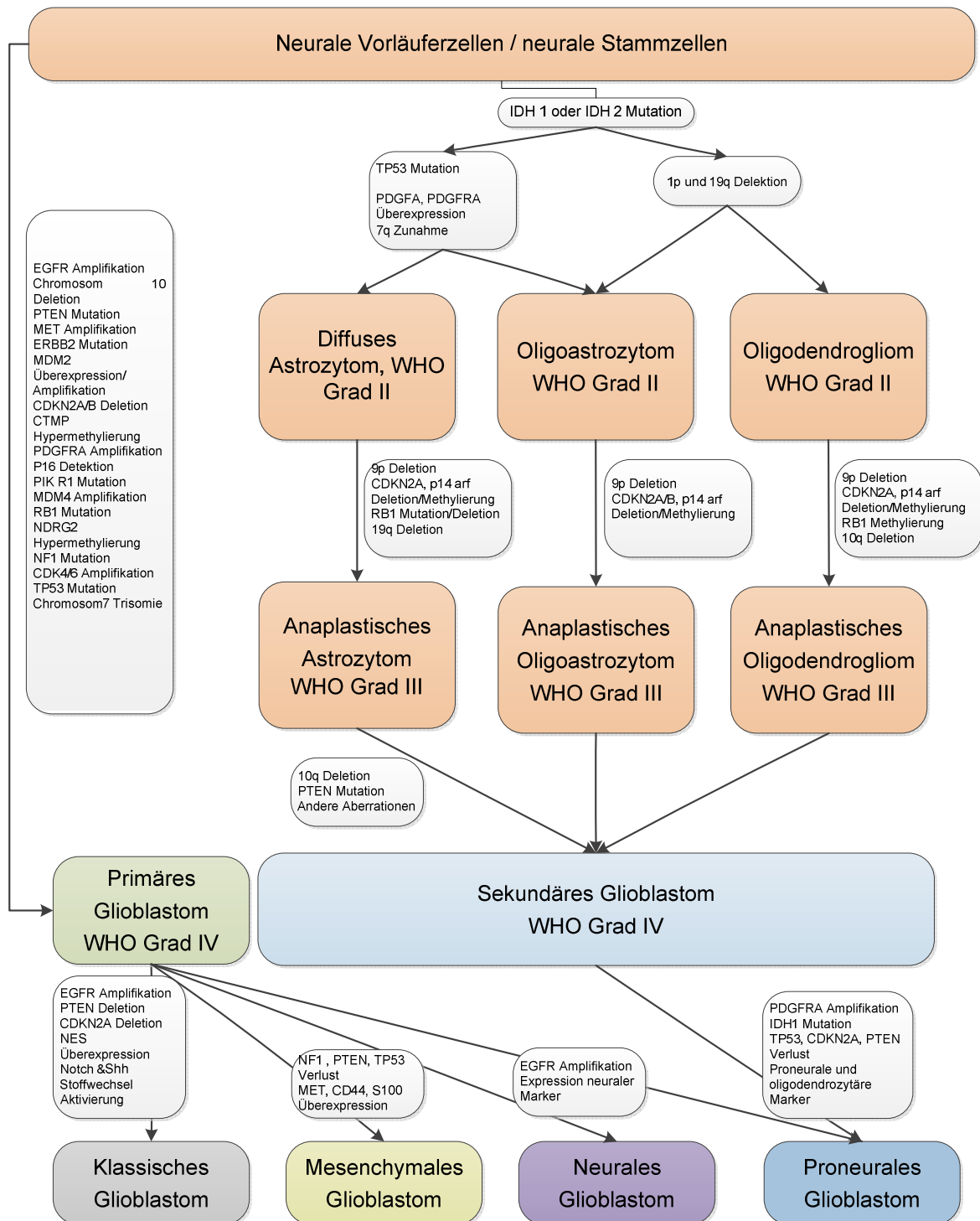


Abbildung 1: Entstehung des primären Glioblastoms mit dessen Subtypen durch verschiedene Mutationen und Entwicklung des sekundären Glioblastoms über die geringgradig, malignen Vorstufen (angepasst nach ((Riemenschneider, 2010) und (Van Meir, 2010)), mit freundlicher Genehmigung beider Autoren)

1.1.3 Histologie und Immunhistologie des GBM

Die Immunhistochemie (IHC) unterscheidet sich von der klassischen Histologie durch den Umstand, dass eine sogenannte Antigen Detektion im Gewebe stattfindet.

Bei der klassischen Histologie reagiert hingegen der verwendete Farbstoff relativ unspezifisch mit dem Gewebe, abhängig von dessen Reaktionsfähigkeit. Die Gewebe können anhand ihres Färbeverhaltens in basophile, azidophile oder neutrophile Strukturen unterteilt werden. Das GBM zeigt dabei, neben einer sehr hohen Mitoserate, einen hohen Zellgehalt mit teilweise spindelförmigen Zellen, wenig Apoptose und ausgeprägte Angiogenese (Louis, 2007).

In der Immunhistochemie bindet ein spezifisch ausgewählter Antikörper an vorhandenen Antigen-Strukturen. Als Antigen bezeichnet man jede Struktur im Gewebe, an die spezifisch ein Antikörper binden kann. Bei der IHC werden überwiegend komplexe Oberflächenmoleküle als Antigene ausgewählt. Dadurch erhält man eine hohe Spezifität der Färbungen. Die entstandenen Antigen-Antikörper Komplexe werden im Anschluss durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Je nach verwendetem Antikörper kann der Farbstoff direkt oder indirekt binden.

Die hohe Spezifität der einzelnen Antikörper ermöglicht eine differenzierte Klassifizierung von Gewebe, auch beim GBM. Je nach Fragestellung bei der Untersuchung von Tumoren finden unterschiedliche Kombinationen von Antikörper Panels Anwendung (einige Beispiele Tabelle 1).

Tabelle 1: Beispiele für einige häufig verwendeten Antikörper in der IHC beim GBM

Antikörper	Anwendungsgebiet
Nestin	Proliferations- und Migrationsmarker im ZNS, Stammzellmarker
Mib 1	Allgemeiner Proliferationsmarker
Vimentin	Primär mesenchymaler Marker
GFAP	Gliale Marker
SOX 2	Neuraler Stammzellmarker
ANA	Detektion von humanen Zellen, hoch selektiv
S100	Neuraler Marker (Glia Detektion)
STAT 3	Transkriptionsfaktor, Malignitätsmarker
CD 31	Endothelialer Marker

Nestin gehört zu den intermediären Filament Proteinen, welches vor allem in den neuronalen Progenitor Zellen (NPC) im zentralen Nervensystem (ZNS) vorkommt. Bei weiterer Differenzierung der Zellen wird das Protein in seiner Stützfunktion durch endgültige Intermediärfilamente ersetzt. Dadurch zeigt sich vor allem bei undifferenzierten Zellen eine deutliche positive Färbung. Es fungiert in der IHC als Proliferations- und Migrationsmarker sowie als Stammzellenmarker (Mokry, 2004). Bei dem GBM kann eine verstärkte Expression von Nestin im Zellkern dargestellt werden (Veselska, 2006).

Mib1, oder auch K-67 genannt, bindet an ein nukleäres Protein, das bei allen aktiven Zellen außerhalb der Ruhephase (Zellzyklus G0) nachgewiesen werden kann. Je höher die Proliferationsrate, desto kräftiger ist die Färbung. Tumore, wie das primäre GBM mit hoher Proliferationsrate, weisen eine kräftig positive Färbung auf. Mib1 eignet sich also insbesondere zur Bestimmung der Proliferationskapazität eines Tumors und damit auch zur Einschätzung der Malignität (Weller, 2004)

Vimentin ist ein intermediäres Filament, welches hauptsächlich in mesenchymalen Gewebe, Fibroblasten und auch Gliazellen vorkommt. Vimentin und das Gliafibrilläre Acid Protein (GFAP) kommen meist zusammen vor, wobei Vimentin früher exprimiert wird (Schiffer, 1986). Es wird als primär mesenchymaler Marker verwendet und zeigt zusätzlich eine positive Detektion bei neoplastischen Astrozyten und reaktiven, peritumoralen Astrozyten (Schiffer, 1986). Vimentin kann beim GBM aufgrund der überwiegend positiven Färbungen im ZNS als Positivkontrolle der immunhistochemischen Methodik verwendet werden (Reifenberger, 1987) (Hirato, 1994). Bei hochpositiven Proben mit negativen anderen Markern liegt meist ein undifferenziertes Sarkom vor.

GFAP gilt als typischer Marker für gliale Tumore und wird klassischerweise zur Abgrenzung des Glioms zu Karzinometastasen oder Lymphomen verwendet (Weller, 2004) (Velasco, 1980).

SOX 2 (sex determining region Y (SRY)- box 2) ist ein neuraler Stammzellenmarker, der in allen Stadien eines Tumors exprimiert wird (Ellis, 2004). Er zeigt eine starke Überexpression im GBM, die bei anderen malignen Hirn-

tumoren eher gering ist. Das Expressionslevel korreliert mit dem Malignitätsgrad der Tumore.

Anti-Nuclei-Antibody (ANA) ist ein selektiver humaner Antikörper, der den Zellkern anfärbt. ANA wird als Marker für humane Zellen bei Versuchen verwendet und ist optimal geeignet für den Detektion der Zellen in Ratten- oder Mausgewebe, da keine Kreuzreaktionen mit falsch positivem Nachweis auftreten (Nih, 2012).

S100 ist ein typischer neuraler Marker bei Gliomen und wird außerdem bei chondroiden Tumoren und Melanomen verwendet. Das Protein kommt im ZNS in der Glia vor und wird bei Hirntumoren zur Diagnostik einer glialen Differenzierung verwendet.

STAT 3 (Signal transducer and activator of transcription 3) ist ein Transkriptionsfaktor, der an vielen verschiedenen Zellaktivitäten wie Wachstum, Differenzierung und der Apoptose Regulation beteiligt ist. Tumore, insbesondere hoch maligne wie das GBM, weisen einen hohen STAT3 Level auf (Sherry, 2009).

1.1.4 Diagnostik, Therapieversagen und Prognose des GBM

Die derzeit übliche multimodale Therapie setzt sich aus einer chirurgischen Resektion, radioonkologischer und medikamentöser Therapie zusammen, da eine kurative Resektion des GBM aufgrund des infiltrativen Wachstums mit mangelnder Kapselbildung selbst durch einen aggressiven chirurgischen Eingriff nicht möglich ist (Larson, 2013; Adamson, 2009; Schakert, 1998).

Über 80% der betroffenen Patienten berichten zu Beginn von erst seit kurzem bestehenden, unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Somnolenz. Die Symptome sind dabei abhängig von der Lokalisation und Ausdehnung des Tumors (Schakert, 1998).

Liegt der Verdacht eines Hirntumors vor, so liegt der Goldstandard zur weiteren Abklärung bei der Magnetresonanztomographie (MRT). Ein Nachweis im Serum oder Liquor mittels Tumormarkern ist bei Gliomen nicht möglich. Das MRT besitzt eine sehr hohe Sensitivität für Veränderungen des Parenchyms und ist für die Diagnostik und auch die therapeutische

Überwachung von hoher Wichtigkeit. Typisch für Gliome im MRT ist eine „ring- bzw. girlandenförmige“ Kontrastmittelanreicherung im Randbereich sowie diffuse Anreicherungen im Zentrum, starke Vaskularisation und zentrale Nekrose (Schakert, 1998). Der typische Tumorrandbereich ist Anzeichen eines peritumoralen Ödems, dieses entwickelt sich im Laufe der Tumorerkrankung durch erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Dabei tritt Serum einschließlich aller Bestandteile in den extrazellulären Raum.

Wie oben beschrieben ist eine kurative Resektion nicht möglich. Ziel des chirurgischen Eingriffes ist daher vor allem eine Rückbildung der neurologischen Symptome, maximale Lebensqualität und eine so weit wie mögliche Verkleinerung des Tumors vor der nachfolgenden Chemotherapie zu bewirken (Larson, 2013). Intraoperativ kann keine klare Abgrenzung zu gesundem Gewebe stattfinden. Umso wichtiger ist die präoperative, sichere Zuordnung der topographischen Lokalisation mittels MRT. Bei 90% der Patienten treten postoperative Rezidive daher unmittelbar im schon operierten Bereich auf (Kleihues, 2000). Ein wiederholter Eingriff ist in den meisten Fällen ineffektiv oder zu invasiv und wird daher nicht vorgenommen.

Erst durch eine unverzüglich postoperativ eingeleitete Histologie lässt sich die Diagnose endgültig stellen. Bestätigt sich der Verdacht eines Glioblastoms, wird eine Kombination mittels Chemotherapie und Medikation veranlasst.

Dabei sprechen gerade die infiltrativen Gliomzellen im Randbereich, die bei Resektion nicht vollständig entfernt werden können, durch die stark reduzierte Zellteilung während der Migration noch sehr viel schlechter auf eine Chemotherapie an, als die hoch proliferativen Zellen im Tumorzentrum (Viapiano, 2009).

Die Prognose hat sich trotz intensiver Forschung und Verbesserungen in Diagnostik- und Resektionsverfahren in den letzten 30 Jahren nicht wesentlich verbessert (Oertel, 2005). Gerade deswegen ist eine weitere Erforschung des Glioblastoms von immenser Relevanz.

1.2 Tumorstammzellhypothese

Stammzellen stellen eine Gruppe von heterogenen Zellen dar, welche die Fähigkeit besitzen, sich unendlich oft zu teilen und sich dabei entweder zu differenzieren oder wieder zu Stammzellen zu werden. Dadurch kann verschiedenes Gewebe aus diesen Zellen im Organismus aufgebaut werden und nicht nur spezifisches, wie bei differenzierten Zelltypen (Zatz, 2014).

Man unterscheidet, je nach Kapazität, totipotente (Bildung aller 216 Gewebe des Körper inklusive Plazenta), pluripotente (Bildung aller Gewebe exklusive der Plazenta), oligopotente (Bildung von nur wenigen Geweben) und unipotente (Bildung nur eines Gewebetyps) Stammzellen (Zatz, 2014).

Auf Grundlage des Wissens und der Erkenntnis der phänotypischen Heterogenität von Tumoren entwickelte sich die Hypothese, dass Tumore von einer kleinen Gruppe stammzellartiger Zellen unterhalten werden, die multipotent sind und Selbsterneuerungskapazität besitzen.

Als erstes konnte dieser Zusammenhang zwischen Stammzellen und proliferativen Erkrankungen bei akuter myeloider Leukämie (AML) bestätigt werden. Bereits 1997 von Dominique Bonnet publiziert, wurde nachgewiesen, dass der Auslöser eine kleine Population von leukozytären, stammzellartigen Zellen ist, die unbegrenzte Proliferationskapazität und die Fähigkeit zum Selbsterhalt aufweisen (Bonnet, 1997) (Reya, 2001). Diese Zellen, allgemein als Tumorstammzellen (CSC: cancer stem cells) oder im Gehirn als Hirntumor initiiierende Zellen (BTIC: brain tumor initiating cells) bezeichnet, wurden wenig später bei weiteren soliden Tumorformen nachgewiesen, beispielsweise: Brust (Al-Hajj, 2003), Pankreas (Esposito, 2002) und Kolonkrebs (Vitiani, 2007).

Die ersten neuronalen Stammzellen (NSC) wurden im 19. Jahrhundert entdeckt. Später stellte man fest, dass diese Zellen vor allem in der adulten Subventrikularzone (SVZ) vorkommen und pluripotente Eigenschaften aufweisen, wie die Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Germano, 2010). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass in der stammzellreichen Region der SVZ am häufigsten Gliome vorkommen (Singh, 2003) (Singh, 2004).

Aus dem Wissen über andere CSC und den NSC heraus entstand erstmals die Idee der sogenannten Tumorstammzellhypothese, diese bietet vor allem im Bereich des GBM einen neuen therapeutischen Ansatz. Sie geht von einer hierarchischen Organisation solider Tumore aus, die von einer kleinen Subpopulation an Hirntumor initiiierende Zellen (BTIC) unterhalten werden. Nur diese Zellen sind zur unbegrenzten Proliferation und Tumorentstehung fähig. Somit könnte nicht die Elimination der differenzierten Tumorzellen (TC), sondern die der BTIC entscheidend für den Therapieerfolg sein (Singh, 2003) (Ignatova, 2002).

In histologischen Untersuchungen von Hirntumoren konnte man dann heterogene Zellpopulationen mit unterschiedlichen Phänotypen feststellen, von denen ein Teil Stammzeleigenschaften aufweist. Bei der Isolierung dieser Zellgruppe konnten einige Parallelen zu neuronalen Stammzellen gefunden werden. So zeigt diese Zellgruppe ein Wachstum *in vitro* unter Stammzellbedingungen mit typischer Bildung von Neurosphären (serumfrei), besitzt die Eigenschaft zu asymmetrischer Teilung, differenziert in unterschiedliche Zelltypen und ist positiv für klassische Stammzellmarker wie Nestin und CD133 (Singh, 2003; Reya, 2001; Tabatabai, 2011). Eine *in vivo* Untersuchung der isolierten CD 133+ Zellen führte zu einer 100% Tumorentstehung, wohingegen die differenzierten Zellen keine Tumore bildeten. Die induzierten Tumore entsprachen dem gleichen Phänotyp wie dem des Ursprungtumors (Singh, 2003). Zusätzlich zeigte sich in Tierversuchen, dass die Mutagen-vermittelte Tumorentstehung in der Region mit hoher NSC Dichte, der SVZ, am effektivsten ist (Singh, 2003) (Singh, 2004).

Ein weiterer Hinweis bezüglich der Rolle der BTIC zeigt die Tatsache, dass viele Patienten nach erfolgter Behandlung mit Resektion der Haupttumormasse und vorerst gutem Ansprechen auf die Standardtherapie eine schnelle Progression zeigen. Man vermutet, dass diese nicht alleine durch das hochgradig invasive Wachstum des GBM, sondern auch aufgrund der Eigenschaften der BTIC, einer Interaktion dieser Zellen mit der Mikroumgebung im Gewebe mit Bildung einer sogenannten BTIC Nische, zustande kommt. Diese Fähigkeit könnte eine erhöhte Resistenz gegen die Standardtherapien erklären. Es kommt zu einer schlechteren Elimination

durch ihre geringe Anzahl und ihrer Interaktion mit dem umliegenden Gewebe. Durch die hohe Proliferationsrate erfolgt dann eine schnelle Regression der Tumore nach ersten Therapieerfolgen (Valent, 2012). Die Theorie der Nischenbildung wird ebenfalls von Yang et al thematisiert. Hierbei wird von BTIC ausgegangen, die sich in einer vaskulären Nische befinden und durch Stimuli der Endothel Zellen (EC) vor Apoptose geschützt sind und ein Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Mitose erzeugen. Eine Interaktion der beiden Zellen konnte *in vivo* gezeigt werden (Yang, 2007). Eine selektive Therapie zur Zerstörung der EC Nische zeigte bei Calabrese et al eine signifikante Verzögerung des Wachstums (Calabrese, 2007).

Diese Forschungsergebnisse bieten die Grundlage für die Hypothese, dass ein malignes Gliom aus neuronalen, multipotenten, maligne transformierten Stammzellen entsteht (Abbildung 1). Geht man von dieser Hypothese aus, so stellen die BTIC die zentrale Rolle für spezifischere Therapieansätze dar. Somit könnten diese in Zukunft als Basis dienen für eine dauerhaft erfolgreiche Therapie.

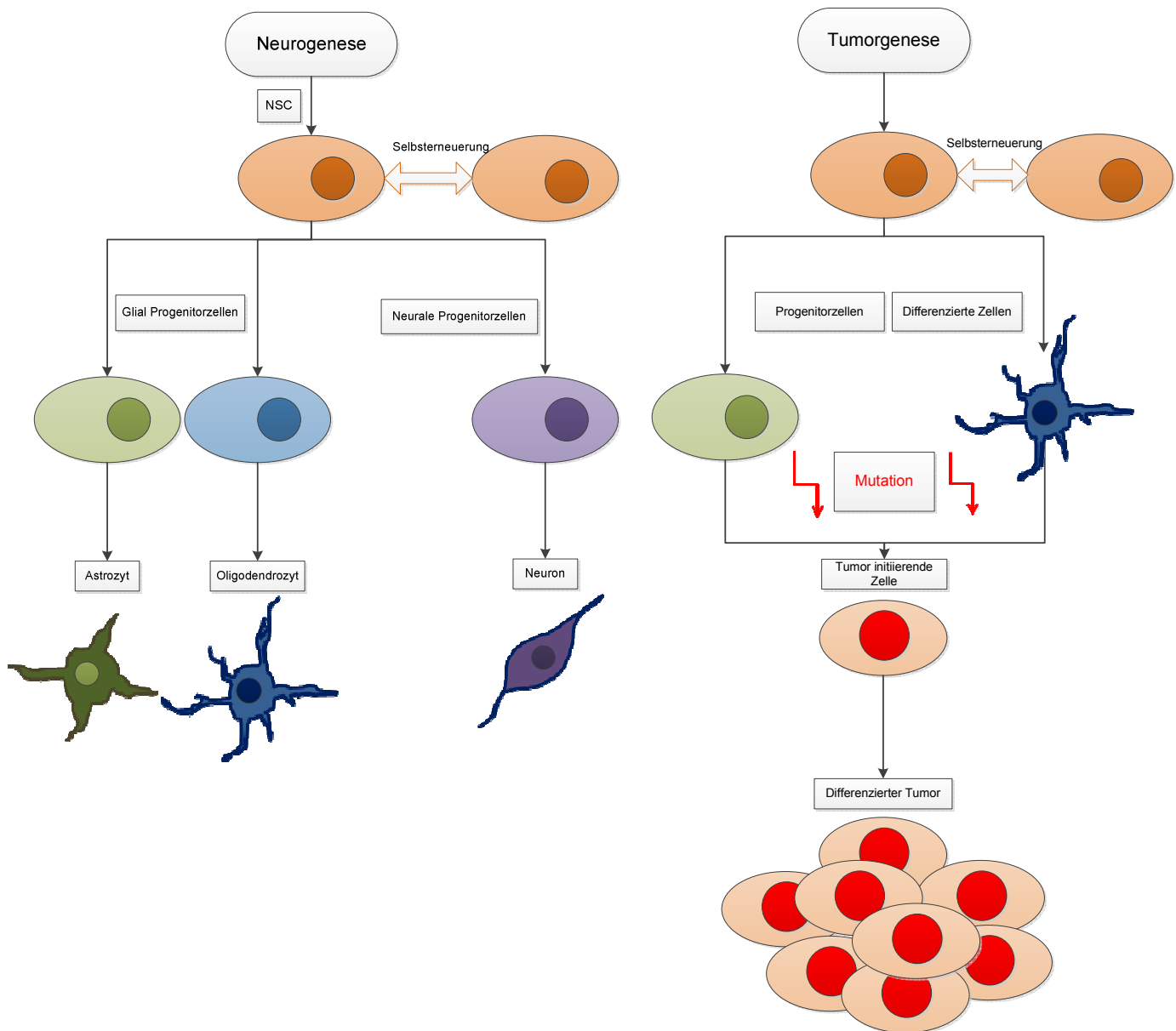


Abbildung 1: Neurogenese und Tumorgenese, die neuronale, multipotente Stammzelle (NSC) als Ursprung für die differenzierten Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen: Entwicklung über die jeweiligen schon differenzierteren Progenitorzellen. Bei der Tumorgenese sind nach der Tumorstammzellhypothese, die NSC ebenfalls der Ausgangspunkt, dabei werden diese jedoch während der Differenzierung durch Mutation zu einer Tumor initiiierenden Zelle (TIC), eine weitere diskutierte Möglichkeit stellt die Dedifferenzierung dar. Dabei geht man davon aus, dass differenzierte Zellen sich durch Mutation zu weniger differenzierten TIC rückentwickeln, (angepasst nach ((Singh, 2004))), mit freundlicher Genehmigung der Autorin)

1.3 Mausmodell

Schon in den 70ern fanden Tiermodelle den Einzug in den Bereich der Hirntumorforschung und leisten seither einen wichtigen Beitrag in der Grundlagenforschung. In einer der ersten Studien von Druckery wurde mittels intravenöser Applikation von Stoffen versucht, Tumore im zentralen Nervensystem zu induzieren (Druckrey, 1964). Seitdem ist, wie auch in anderen Bereichen der Forschung, in der Neurologie der *in vivo* Versuch von hoher Wichtigkeit.

Bei jedem Tierversuch muss sichergestellt werden, dass die Modelle gut charakterisiert, einfach reproduzierbar und gut durchführbar sind. Je nach Fragestellung stehen verschiedene Tierarten oder verschiedene knock out Modelle zu Verfügung. Diese müssen entsprechend dem geplanten Versuchsschwerpunkt ausgewählt und behandelt werden.

1.3.1 GBM-Nacktmausmodell

Gerade im Bereich der Glioblastome, die durch ihr ausgeprägtes Potential zur Differenzierung und Migration hoch maligne sind, ist ein *in vivo* Modell mit konstanten physiologischen Mikromilieu über die gesamte Versuchsdauer essentiell. Ein adäquates Langzeitmodell in der Zellkultur oder an isoliertem Gewebe ist heute technisch noch nicht simulierbar.

Zur Verfügung stehen verschiedene etablierte Tiermodelle, alle weisen ein gutes Wachstum von humanen, orthotop implantierten Zellen auf. Wichtigste Eigenschaft der Tiere stellt ein nicht kompetentes Immunsystem dar, um ein gutes Wachstum der humanen Zellen zu gewährleisten und damit als sicheres Xenograft Modell zu Verfügung zu stehen.

Die in der Forschung am häufigsten verwendeten Tiermodelle stellen Mäuse dar. Darunter besonders die Gruppe der nude Mäuse. Dabei sind alle Tiere mit nude-Gen athymisch und damit T-Zell-los. Ursache dafür ist eine Kopplung beider Gensequenzen, diese werden bei Zucht immer zusammen vererbt. Der Ursprung dieses Merkmals lag in einem zufällig auftretenden Gendefekt bei der normalen Hausmaus. Durch eine sogenannte Auszucht wurde dieses Merkmal dann gezielt manifestiert. Es gibt viele verschiedene Linien der nicht immunkompetenten Mäuse, unter

anderem die NMRI nu/nu Maus. Der Phänotyp dieser Mäuse zeigt sich im Bild einer fehlenden Körperbehaarung. Durch die schlechte Reproduktion der ursprünglichen Nude Maus wurden dann von Dr. Rygaard aus Glasgow durch einen Gentransfer die gewünschten Merkmale in die NMRI Mäuse gebracht. Daraus ging die heute als NMRI nu/nu Maus oder kurz auch als Nacktmaus bezeichnete Linie hervor. Durch Auszucht, einer Zuchtmethode, bei der Verwandtschaftsverpaarung vermieden wird, wird ein maximaler Genpool mit homozygoter Vererbung der gewollten Merkmale gewährleistet. Die heutigen Generationen der NMRI nu/nu Mäuse besitzen keinen funktionsfähigen Thymus und können dadurch nahezu keine T-Lymphozyten bilden. Bei Mäusen mit Thymusaplasie werden keine Thymozyten gebildet, so kann auch keine Reifung zu T-Lymphozyten erfolgen. Die Anzahl der B-Zellen ist dabei weitgehend normal.

Eine Besonderheit in der Gruppe der Nude Mäuse bilden zum Beispiel die NIH-III Nude Mäuse, diese besitzen zusätzlich zu der Thymusaplasie noch defekte, natürliche Killerzellen (NK) und T-Lymphozyten, reifungsunabhängige B-Lymphozyten. Die NK sind dabei *in vitro* zytotoxisch für Tumorzellen, sodass diese Tiere ungeeignet für onkologische Modelle erscheinen (Charles River, 2014).

Neben den NMRI nu/nu Mäusen eignen sich noch verschiedenste Linien als onkologische Modelle, wie beispielsweise die Black six oder die NOD SCID, beides vollständig behaarte Linien.

1.3.2 Prinzip des Modells

Die Erforschung im Mausmodell ermöglicht es, die implantierten humanen Glioblastomzellen im maximal möglichen physiologischen Mikromilieu über einen längeren Zeitraum zu untersuchen.

Durch die orthotope Implantation mithilfe eines stereotaktischen Rahmens ist eine exakte reproduzierbare Implantation gewährleistet.

Da ein Hauptteil der Gliome im Großhirnbereich auftritt, wird auch im Tiermodell dort implantiert. Die Region des frontalen Kortex hat sich in vielen Publikationen als besonders geeignet dargestellt. Es zeigte sich, dass dieser Punkt bei Tumorwachstum am wenigsten neurologische Defizite

hervorrufen und mittels stereotaktischen Eingriffes auch als gut reproduzierbarer Punkt verwendet werden kann (Singh, 2004) (Beier, 2007).

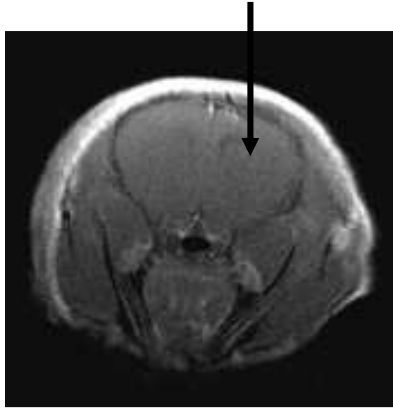


Abbildung 2: Koronare Schnittebene (MRT) durch das Gehirn einer Maus auf Höhe der gängigen Implantationsstelle

Nach Implantation können die humanen Zellen nahezu wie im humanen Gewebe agieren. Dies ermöglicht eine maximal mögliche Erforschung noch unklarer Stoffwechselvorgänge, Verhalten der Zellen und auch Tests von neuen, essentiellen Therapieansätzen.

1.4 Intrakranielle Tumore in der Tiermedizin

Tumorerkrankungen bei geriatrischen Patienten haben auch in der Tiermedizin durch die verbesserte medizinische Versorgung und das steigende Alter eine zunehmende Bedeutung. Dies ist vornehmlich bedingt durch den immer höheren Stellenwert der Haustiere in der Gesellschaft und geht einher mit einer größeren Bereitschaft und Nachfrage zur näheren Diagnostik und entsprechenden Therapie bei onkologischen Patienten. Die chirurgische Behandlung von operablen Tumoren stellt dabei vor allem bei Kleintieren den Hauptteil an Tumorthherapie dar, jedoch wächst die Zahl der chemotherapeutischen Behandlungen im Praxisalltag stetig an.

Die Inzidenz von allen Tumoren des Nervensystems wurde dabei bei Hunden untersucht und liegt bei 14,5 Fällen pro 100.000 Tieren (Schneider, 1978). In neueren Studien über das Vorkommen von intrakraniellen Tumoren bei Hunden ergab bei 2-4,5% aller post mortem untersuchten

Tieren einen positiven Befund (Song, 2013). Erste Fälle von primären Hirntumoren beim Hund wurden in den sechziger Jahren berichtet. Von den dabei untersuchten 24 Fällen konnte bei zwei ein GBM diagnostiziert werden (Schiefer, 1962). In weiterer Literatur wurden in verschiedenen Fallbeispielen mehrere pathologisch bestätigte Gliome befundet, darunter auch eine Boxerhündin mit GBM im rechten Lobus piriformis (Jacob, 2010). Bei aktuellen Untersuchungen über die Verteilung von Hirntumoren beim Hund wurden in der Gruppe der Astrozytome 20% als GBM eingestuft (Dickinson, 2014).

Durch die Bildung von hoch spezialisierten onkologischen Zentren mit geeigneten bildgebenden Verfahren sowie spezialisierter chirurgischer Ausstattung konnte in den letzten Jahren schon eine signifikante Verbesserung der Versorgung der betroffenen Patienten stattfinden (Dickinson, 2014). Die Diagnose basiert dabei, wie in der Humanmedizin, auf einer histopathologischen Untersuchung von Gewebe. Dabei wird mittels MRT eine stereotaktische Biopsie vorgenommen. Neben den verschiedenen Therapieansätzen bei dem Einzeltier wird in der Tiermedizin vor allem versucht, genetische Prädispositionen zu verifizieren und durch gezielte Zucht zu reduzieren.

Durch die Übernahme von humanen Techniken und Therapien in die Tiermedizin steigen die Möglichkeiten zur Diagnose und Therapie von intrakraniellen Tumoren immer mehr an. Als limitierender Faktor kann derzeit jedoch der hohe Aufwand mit den entsprechend hohen Kosten gesehen werden, der nicht von vielen Patientenbesitzern geleistet werden kann (Dickinson, 2014). Die aktuelle Forschung im Bereich des humanen GBM könnte in Zukunft aber auch in der Tiermedizin zu einer kostengünstigeren, standardisierten Therapieform führen.

1.5 Ziel der Dissertation

Das GBM stellt aufgrund seiner schlechten Prognose einer der wichtigsten primären Hirntumore des Menschen dar. Seine Malignität ist vor allem durch seine schnelle Regression trotz multimodaler Therapie bedingt. Die Problematik bei der Therapie ergibt sich insbesondere durch sein infiltratives Wachstum, Migration von einzelnen Zellen und seine hohe Proliferationskapazität. Bisherige Versuche gezielter Therapien konnten noch keine wesentliche Verlängerung der Überlebenszeit erreichen.

Einen möglichen Ansatz könnten die seit neuesten, bei Tumoren nachgewiesenen undifferenzierte Zellen, die Parallelen zu Stammzellen zeigen, darstellen (Singh, 2003; Reya, 2001; Tabatabai, 2011). Diese wurden unter anderem beim GBM gefunden. Die Frage, ob und in welchem Umfang undifferenzierte Zellen mit stammzellartigen Eigenschaften der Ursprung bei dem GBM sind, ist noch nicht vollständig erforscht.

Das Ziel dieser Dissertation war es daher, die Tumorinduktion und das Invasionsverhalten humaner Tumorzellen (TC) und hirntumorinitiierender Zellen (BTIC) im Nacktmausmodell zu vergleichen. Zudem wurde überprüft, ob neurale Vorläuferzellen (NPCs) aus tumorfreiem, humanen Hippocampus im Nacktmausmodell Tumore induzieren und so als potentielle „cell of origin“ für Entstehung von BTICs fungieren können. Die Stammzeleigenschaften der BTICs wurden dabei, neben ihrer Fähigkeit unter serumfreien Bedingungen zu proliferieren, durch den Expressionsnachweis verschiedener Stammzellmarker (zum Beispiel CD 133, Nestin, Sox2, GFAP) vor Implantation charakterisiert.

Ein weiteres Ziel war es, ein reproduzierbares *in vivo* Modell auf Basis von intern kultivierten BTICs aus frischen Gewebe zu etablieren. Hierzu sollten nur gut charakterisierte Zelllinien für die Implantation verwendet werden, die auch für weitere Forschungsarbeit der Institute der Uniklinik Regensburg einsetzbar sein sollten. Eigene BTICs stellen dabei ein weitaus besseres Modell als herkömmliche, kommerziell erwerbliche Linien dar. Im Gegensatz zu frei käuflichen Linien sollten diese direkt aus frischem Tumorgewebe isoliert und in Kultur genommen werden. Zellen niedriger Passagen aus bekannten Tumoren können so in großen Umfang - reproduzierbar für

weitere Projekte - eingesetzt werden. Die Problematik der kommerziellen Linien, bei denen oft unklare Passagen mit unterschiedlichen Mutationen vorliegen, wurde so vermieden.

Als weiteres Ziel sollte die These, dass die Fehldifferenzierung von Vorläuferzellen zur Tumorinitiierung und zum Unterhalt der Tumore führt, unterstützt werden. Diese Erkenntnisse könnten für geeignete therapeutische Ansätze zur Hemmung von Fehldifferenzierung oder zur Beschleunigung der Ausdifferenzierung und somit zur Hemmung der Selbsterneuerung des Tumors genutzt werden. Darüber würden sich völlig neue Therapieansätze ergeben und eine Möglichkeit bieten, die schnelle Progression des GBM zu reduzieren.

Zusätzlich sollte neben den genannten Hauptzielen ein auf MRT basierendes Monitoring Modell für die nude Mäuse etabliert werden, um eine *in vitro* Untersuchung des Tumorwachstums zu ermöglichen.

2 Material

2.1 Medien und Zusätze

Tabelle 2: Medien und Zusätze

Name	Firma
Cell Dissociation Solution	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim, Deutschland
EGF (rec. Human Epidermal-Growth-Factor)	R&D Systems, Deutschland
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
FGF (rec. Human Fibroblast-Growth-Factor basic)	PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
NE-AS (Nichtessentielle Aminosäuren)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim, Deutschland
PBS ohne Ca und Mg (Phosphat-Buffer-Saline)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
RHB-A	Stem Cells, Abingdon, United Kingdom
Trypanblau	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
BME-Vitamine	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Methylbutan	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Xylol	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Neo Mount	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Deckgläser	Carl Roth GmbH CO KG, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Carl Roth GmbH CO KG, Karlsruhe, Deutschland
Rundfilter MN	Macherey- Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland
Tissue Tek OCT Compound	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik GmbH, Würzburg, Deutschland
Microtome Blade R35	Feather Safety Razor Co., Japan
Objektträger, Superfrost Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham
Sicherheitsklingen	Apollo, Solingen/Herkenrath
Einmalhandschuhe, Roti Protect	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pinzel, Rotmarder (3-0/2-0)	Da Vinci, Deutschland
Spatel	VWR International GmbH, 30171 Hannover
Safety Multifly-Set, 23 G	Sarstedt AG und Co., Nürnbrecht, Deutschland
Metzenbaum	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Arterienklemmen	Aesulap AG, Tuttlingen, Deutschland
Spitzenfilter 0,22µm	TPP-Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
15ml Behälter	Sarstedt AG und Co., Nürnbrecht, Deutschland
Metzenbaum	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Arterienklemmen	Aesulap AG, Tuttlingen, Deutschland
Infusionsbesteck	SOLUFLO Disponed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
3 Wege Hahn	SOLUFLO Disponed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Spitzenfilter 0,22µm	TPP-Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Fixationsklemmen	Aesulap AG, Tuttlingen,

	Deutschland
15ml Behälter	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
NaCl	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Gadovist	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland
Braunüle 26G	BD Neoflon, Heidelberg, Deutschland
Sofsilk 4-0	Covidien Deutschland GmbH, Neustadt
Plexusblockade	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen (1ml, 2ml, 20ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf Mikroreaktionsgefäß	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Sekundenkleber	Pattex, Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Infusionsverlängerungen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Desinfektionsspray, Sofasept N.	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Ohrmarken	H. Hauptner & Richard Herberholz GmbH & Co. KG, Solingen, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim, Deutschland
Kanülen (20G/27G/30G)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pro Ophta, Augenstäbchen	Lohmann & Rauscher GmbH und Co KG, Neuwied, Deutschland
Sofsilk 4-0	Covidien Deutschland GmbH, Neustadt
6-Well Platte	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Reaktionsgefäße (15ml/50ml)	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Spritzen (1ml, 2ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen (T25/T75)	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.3 Antikörper

Alle immunhistologischen Färbungen im Rahmen dieser Dissertation wurden in Kooperation mit der Neuropathologie des Klinikums angefertigt.

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Firma
STAT 3	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Nestin	Millipore Corporation, Billerica MA, USA
SOX2	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
CEBP-β	Abcam, Cambridge, USA
CD31	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
S 100	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
GFAP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Aktin	Chemicon-Millipore Corporation, Billerica MA, USA
Mib1	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Vimentin	Novocastra – Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, United Kingdom
Chromo	Chemicon-Millipore Corporation, Billerica MA, USA
Synapthophysin	BioGenex, Fremont, USA
CD 99	Signet-Covance GmbH; München, Deutschland
EMA	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Desmin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
ANA (Anti-Nuclei Antibody), MAB1281	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland

2.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Name	Hersteller
Eosin G	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin kristallin	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Aluminiumkaliumsulfat	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Chloralhydrat	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland
NaCl 0,9%	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Destilliertes H₂O	Universität Regensburg, Deutschland
NaH₂PO₄	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
Na₂HPO₄	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH CO KG, Karlsruhe, Deutschland
Succrose	Merck Sharp & Dohme Corp., Darmstadt, Deutschland

2.5 Sedation

Tabelle 6: Sedativa

Medikament	Hersteller
Isofluran	Baxter, Deerfield, USA
Ketamin 10%	WDT, Henry Schein Vet, Hamburg, Deutschland
Xylazin 2%	Serumwerk Bernburg Vertriebs- GmbH, Bernburg, Deutschland
Vetranquil 1%	CEVA, Henry Schein Vet, Hamburg, Deutschland
NaCl 0,9%	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland

2.6 Geräteliste

Tabelle 7: Geräteliste

Materialien	Hersteller
Schnittstrecker	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar
Gefriermikrotom (Leica CM 1950)	Leica Biosystems Nussloch GmbH Nussloch, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham
3 Tesla MRT	Siemens Health Care, Siemens AG, Deutschland
Model 900LS Small Animal Stereotaxic Instrument	Kopf, Tujunga, Californien
Arterien Klemmen	Aesulap AG, Tuttlingen, Deutschland
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co., Japan
Metzenbaum Schere	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Heizplatte, Model OTS 40	MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Hamilton 10µl	VWR International GmbH. Tiestestr. 16 -18 30171 Hannover
Wärmelampe 5003	CONDEL, Deutschland
Diamatbohrkopf	Henry Schein, Dental Depot
Zahnbohrer MIO 2000	NSK Europe GmbH Eschborn, Deutschland
Bohr-Kopf BB-Y MIO	NSK Europe GmbH Eschborn, Deutschland
Winkelstück EX MIO	NSK Europe GmbH Eschborn, Deutschland

2.7 Probenmaterial

Alle verwendeten humanen Gewebe wurden vor der Weiterverarbeitung histopathologisch untersucht und entsprechend der Diagnose nach den WHO Kriterien (Louis, 2007) eingeteilt. Bei dem als NPC verwendeten humanen Gewebe wurde ebenfalls zum Ausschluss von pathologischen Veränderungen eine histologische Untersuchung durchgeführt.

2.7.1 Humane GBM Zelllinien

Die humanen Zellen wurden unmittelbar postoperativ aus zerkleinertem Tumorgewebe gewonnen und in Kultur genommen.

Tabelle 8: Probematerial humane GBM Zelllinien

Name	Diagnose Pathologie
RAV 17	Primäres GBM
RAV 19	Primäres GBM
RAV 20	Primäres GBM
RAV 21	Primäres GBM mit Übergang ins Gliosarkom
RAV 28	Primäres GBM
RAV 39	Primäres GBM

RAV (Regensburg- Arabel Vollmann), BTIC (brain tumor-initiating cells)

2.7.2 Hirntumor initiiierende Zellen und Tumor Zellen

Tabelle 9: Probenmaterial RAV 39 und RAV39-D

Name	
RAV 39-D	TC, primäres GBM
RAV 39	BTIC, primäres GBM

RAV (BTIC, Undifferenzierte humane Tumorzellen) und RAV-D (TC, differenzierte humane Tumorzellen)

2.7.3 Humane neuronale Vorläuferzellen

In Kooperation mit der Universität Freiburg (PD Dr. A. Weyerbrock, Neurochirurgie) wurde frisches, humanes Gewebe zur Verfügung gestellt. Das frische Gewebe wurde im Rahmen einer Hypokampektomie bei Epilepsie Patienten gewonnen, an der Universität Regensburg kultiviert und als neuronale Progenitorzellen verwendet.

Tabelle 10: Probenmaterial NPC

Name	
FB 2	NPC

NPC (neurale Progenitorzellen, FB: Freiburg)

2.8 Mausmodell

Für die Vorversuche wurden 25 NOD SCID Mäuse verwendet, gehalten in einer geschlossenen Tierhaltung der Uniklinik Regensburg.

Für die Hauptversuche wurden immundefiziente NMRI nu/nu Mäuse (nachfolgend als nude Mäuse bezeichnet) aus der Eigenzucht der Universität Regensburg verwendet.

Die weiblichen NMRI nu/nu Mäuse wurden aus der Eigenzucht der Universität Regensburg im Alter zwischen 8-10 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von 25g verwendet. Es wurden weibliche Tiere für dieses Tiermodell herangezogen, da in dieser Population die Anzahl der weiblichen Tiere höher war und eine bessere Selektion nach Alter und Gewicht erfolgen konnte. Es wurde davon abgesehen, männliche und weibliche Tiere zu durchmischen, um eine geschlechtsspezifische Varianz auszuschließen.

NMRI Mäuse zeigen eine gute Reproduktion und sind an dem Institut Regensburg etabliert. Die Wurfgrößen liegen dabei im Durchschnitt bei 12 Tieren. Sie wurden über einen Zeitraum von insgesamt 12 Wochen in einem konventionellen System der Tierhaltung in einem gesonderten Inkubator gehalten. Der zum Versuchszweck verwendete Tierstall besteht aus acht Räumen mit Mäusen, Ratten, Gerbils und Kaninchen. Die Hygienemaßnahmen vor Betreten der Tierräume bestanden aus Desinfektion der Hände, Handschuhe, Einmalkittel und Einmalüberziehschuhen.

2.8.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden in einem konventionellen Haltungssystem der Uniklinik Regensburg gehalten.

Tabelle 11: Daten der konventionellen Tierhaltung

Klimatisierung	21°C +/- 1°C Raumtemperatur
	55% +/- 10% Luftfeuchte
	16h Luftwechsel
Versorgung	Schwebstofffilter
	Futter ad libitum: Sniff (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland)
	Tränkflaschen mit Wasser ad libitum
	Käfig Typ III mit Gitterdeckel
	Einstreu Lingnocel ³ / ₄ (Altromin Spezialfutter GmbH und Co KG)
Gesundheitsüberwachung	Käfigwechsel mindestens 1 x wöchentlich
	1x im Jahr über Bestands Sentinel, im Versuch täglich durch Gewichtsmonitoring und Adspektion

Die Gesundheitsüberwachung des Haltungssystems fand einmal im Jahr mittels sogenannten Bestands Sentinel statt. Diese, auch als Anzeigetiere bezeichneten Mäuse, werden in Käfigen mit verunreinigten Streu aus allen Gruppen eines Raumes gesetzt und dann zur Erhebung des Gesundheitsstatus herangezogen. Dies findet vor allem Anwendung in Beständen, in denen kein Einzeltier einer Gruppe entbehrlich ist.

3 Methoden

Alle hier erfolgten Tierversuche fanden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes statt und wurden von der Regierung Oberpfalz genehmigt (AZ: 54-2532.1-30/11).

Im Rahmen von Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden 25 Mäuse mit acht verschiedenen Zelllinien orthotop implantiert, nach 10 Wochen ein MRT erstellt, die Gehirne innerhalb von 12 Stunden post MRT konserviert und histologisch untersucht. Zu jedem Käfig mit je sechs implantierten Tieren wurde pro Käfig eine Kontrollmaus gesetzt. Die Kontrollmäuse dienten dem Vergleich zu den mit Tumorzellen implantierten Tiere, wurden jedoch anstatt mit tumorösen Zellen nur mit Medium implantiert.

Auf Basis dieser Vorversuche wurden im Hauptversuch 48 Tiere implantiert. Die Tiere wurden in zwei Hauptgruppen mit je drei Untergruppen zu je acht Tieren unterteilt. Zu jeder Untergruppe wurde eine Kontrollmaus gesetzt.

Der Endpunkt wurde auf 12 Wochen festgelegt und die Tiere nach dem MRT mittels kardialer Perfusion beendet, das Gehirn mittels Kryostaten geschnitten und histologisch sowie immunhistologisch untersucht.

3.1 Zellkultur

Das zerkleinerte und gewaschene, frisch resezierte Tumorgewebe wurde in ein wie oben beschriebenes Kulturmedium in einer 6-Well Platte im Brutschrank bei 37°C, 80% relativer Luftfeuchte und 20% O₂ und 5% Co₂ kultiviert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte einmal wöchentlich, wobei ca. 50% ersetzt wurden. Bei jedem Wechsel wurden die Zellen lichtmikroskopisch beurteilt und je nach Wachstum gesplittet. Dabei wurden eine Million Zellen pro ml Medium aufgenommen und wieder in Kultur genommen. Beim ersten Splitten wurden die Zellen in entsprechende Zellkulturflaschen umgesetzt, dabei der Überstand abgesaugt und mit PBS mehrfach gespült. Mittels 0,5ml Trypsin (bei BTIC/NPC Cell Dissociation Solution) wurden die adhärennten Zellen im Anschluss gelöst, die enzymatische Reaktion mittels 2ml Kulturmedium nach einer Minute gestoppt und die nun zu Spheres geformten Zellen in Suspension in einem 15ml Röhrchen 5 Minuten lang bei

1200U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5ml frischem Medium aufgenommen. Die nun wieder in Suspension befindlichen Zellen wurden erneut in Kultur genommen oder für die Implantation verwendet.

Bei den differenzierten Tumorzellen wurde als Medium DMEM 10% FCS verwendet, bei den BTIC und NPC RHBA Stammzellmedium.

Tabelle 12: Zusammensetzung Kulturmedien

Medium TC	Medium BTIC/NPC
Dulbeccos MEM	RHBA Stammzellmedium
10% FCS	1% Penicillin/Streptomycin
1% L-Glutamin	Wachstumsfaktor EGF
1% Vitamine	Wachstumsfaktor FGF
1% nichtessentielle Aminosäuren	
1% Penicillin/Streptomycin	

3.1.1 Zellzahlbestimmung

Vor der Implantation erfolgte eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer mit Trypanblau Färbung im Verhältnis 1:1,25. Hierzu wurde das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Insgesamt wurden 40µl Suspension mit 10µl Trypanblau versetzt und in die Zählkammer einpipettiert. Avitale Zellen mit instabiler Membran erscheinen durch den eingelagerten Farbstoff blau.

Durch das definierte Volumen von 0,1 µl kann die Zellzahl pro ml wie folgt berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte vitale Zellen} \times 1,25 \times 10.000$$

3.1.2 Vorbereitung der Zellsuspension präoperativ

Pro Mausgruppe wurde für die Implantation der Zellen dieselbe Passage verwendet. Diese wurden unmittelbar vorher, wie oben beschrieben, für die Implantation vorbereitet und in PBS entsprechend der benötigten Zellzahl aufgenommen.

In den Vorversuchen wurden 10.000 Zellen pro 10µl verwendet, dieses wurde bei den letzten Tieren auf 5µl reduziert. Da in den Vorversuchen

keine Probleme mit der Stabilität der Zellsuspension auftraten, wurde im Hauptversuch das Volumen weiter auf 2 µl reduziert.

Abhängig von der Untergruppe befanden sich in der Suspension 10.000, 1.000 oder 100 Zellen. Bei den Kontrollmäusen wurde 2 µl reines PBS verwendet.

Die Kontrollmäuse dienten als Vergleich von Körpergewicht und Körpergröße, Habitus sowie Methodik zu den mit Zellen implantierten Tieren. Um Suspensionsfehler und eine blasenfreie Aufnahme der Suspension zu gewährleisten, wurde pro Tier mindestens 2,5µl Volumen vorbereitet.

Aufgrund der Länge des Eingriffes pro Maus wurden nach maximal 3 Stunden frisch geerntete Zellen gleicher Linie und gleicher Passage verwendet. Die Zellen in Suspension wurden auf Eis bei -5°C kühl bis zur Implantation gelagert und pro Tier frisch in die verwendete 10µl Hamilton Spritze aufgenommen.

3.2 Vorversuch

In den Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden insgesamt 28 Tiere orthotop implantiert. Dabei wurden sechs Hirntumor induzierende Zelllinien (BTIC), eine neurale Progenitorzelllinie (NPC) als Kontrollgruppe und vier Kontrollmäuse verwendet.

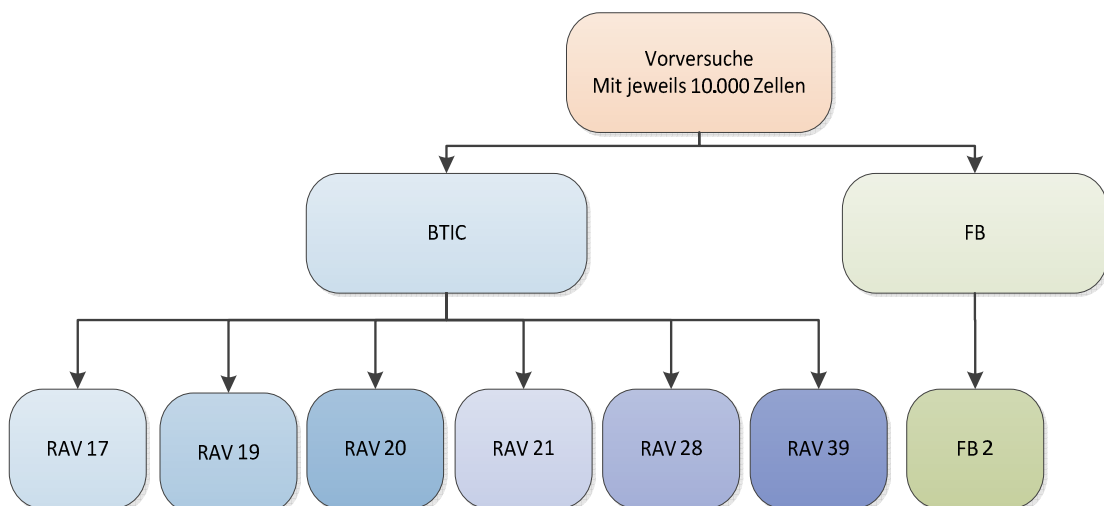


Abbildung 3: Versuchsaufbau der Vorversuche: RAV: BTIC, FB: NPC

Pro Gruppe wurden 3-4 Tiere (RAV 20 sechs Tiere) eingeteilt und nach klinischen Symptomen oder spätestens nach 12 Wochen beendet.

3.3 Versuchsplan und Endpunkte

Für die TC- und BTIC- Gruppen wurde eine Zelllinie ausgewählt und einmal unter Stammzellbedingungen und einmal mit herkömmlichen Medien kultiviert. Die differenzierten und stammzellartigen Zellen - aus demselben GBM gewonnen - wurden anschließend mit einer festgelegten Zellzahl (10.000, 1.000, 100) orthotop injiziert.

Im Detail ist der Versuchsablauf wie folgt: in je acht Tieren einer Behandlungsgruppe wurden an Tag Null die entsprechenden Zelllinien (BTIC und TC) mit 3 verschiedenen Zellzahlen orthotop stereotaktisch implantiert.

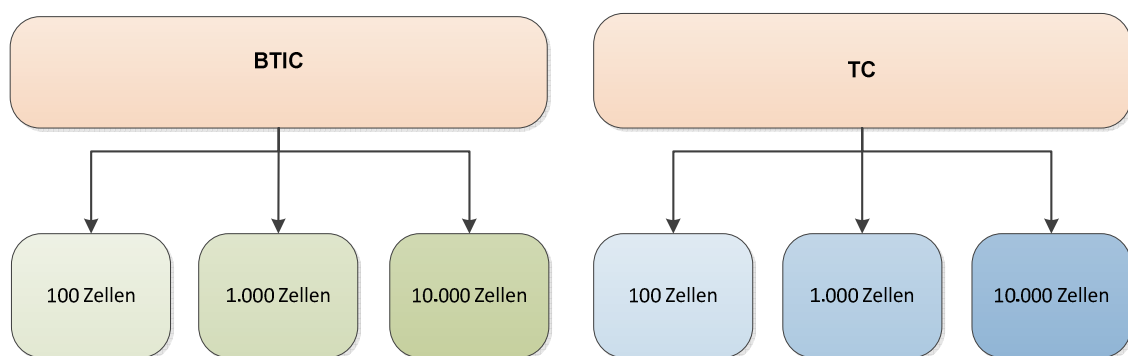


Abbildung 4: Versuchsaufbau: Hauptversuch

Die Tiere wurden nach 12 Wochen oder bei Auftreten klinischer Symptomatik für die bildgebende Verlaufsbeobachtung (3T MRT) herangezogen, nach dem MRT mittels kardialer Perfusion beendet und für die immunhistologischen Untersuchungen verwendet. Die dabei genutzten immunhistologischen Marker wurden zur näheren Differenzierung des veränderten Gewebes herangezogen.

3.3.1 Biometrische Planung

Die benötigte Tierzahl wurde auf Basis von zu erwartenden Ergebnissen durch Literaturrecherchen und durch statistische Berechnung mit dem Fisher exact Test mithilfe von G*Power 3.2.1 (statistische Software) durchgeführt. Hierbei wird ein Signifikanztest auf Basis von zuvor definierten Zielgrößen von zwei unterschiedlichen Gruppen durchgeführt.

Als Hauptzielgröße wurde die Tumorinzidenz gewählt, als Nebenzielgrößen wurden MRT und immunhistologische Ergebnisse verwendet.

Tabelle 13: Annahme zur Berechnung der statistischen Wahrscheinlichkeit

Fehler 1 Art	0,05
Fehler 2 Art	0,2
Biologisch relevante Differenz	80%

Auf Basis des Tests wurde eine Gruppengröße von acht Tieren angegeben (s. Anhang 9.1.1). Je Gruppe wurde ein Reservetier für eventuelle Ausfälle beantragt.

Insgesamt wurden 60 Tiere für den Hauptversuch verwendet. Da sechs Tiere intraoperativ bei der orthotopen Implantation verstarben, wurden 48 von ihnen mit Zellen implantiert und untersucht. Zusätzlich wurden sechs Tiere als Kontrolle mitgeführt.

3.3.2 Festlegung der End- beziehungsweise Abbruchpunkte

Die Wahl des Endpunktes stützt sich auf die Ergebnisse des Vorversuches sowie auf Angaben in der einschlägigen Literatur (Beier, 2007). Die für uns ebenfalls relevante Größe des Tumors zur Darstellung mittels MRT sollte zu diesem Zeitpunkt einen entsprechenden Durchmesser aufweisen.

Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer täglich kontrolliert und nach dem unten aufgeführten Score-System beurteilt. Sobald ein Tier bei einem Kriterium drei Punkte oder insgesamt acht Punkte erreicht hatte, wurde das Einzeltier aus dem Versuch genommen.

Unter nachfolgenden Kriterien wurde die gesamte Gruppe beendet:

- wenn 50% der Tiere einmalig über drei Punkte in den Einzelkriterien erreichten,
- wenn mehr als 80 Punkte in einer Gruppe von 10 Tieren vergeben wurden.

Eine Beurteilung der Tiere nach dem Score System erfolgte in der ersten Woche post Operation und ab der achten Woche bei Auffälligkeiten täglich. Eine Gewichtskontrolle fand während der kompletten Versuchsdauer täglich statt (s. Anhang 9.2).

Tabelle 14: Bewertungs-Score der Versuchstiere

<u>Punkte x jeweilige Tierzahl, die die Kriterien erfüllen</u>	0	1	2	3
<u>Prozentuale Reduktion des Körpergewichts</u>	< 5%	10%	15%	20%
<u>Verhalten</u>	aufmerksam, munter, in der Gruppe aktiv unauffällig	ruhiger, noch in der Gruppe	absondern von der Gruppe, noch Interaktion mit Tieren in der Umgebung Tier zeigt kaum noch aktive Aufnahme	apathisch, teilnahmslos
<u>Futter-/Wasser-aufnahme</u>		Tier wird seltener aktiv am Futter/Wasser gesehen		Keine Aufnahme mehr
<u>Abwehr-/Schmerz-reaktion</u>	unauffällig, normale Reaktion	deutliches Abwehrverhalten	starke Abwehr, Aggressivität schon bei leichten Handling	keine Abwehrreaktion mehr, auch bei Provokation
<u>Atmung</u>	unauffällig (ca. 163/min)	milde erhöhte Frequenz, keine Einschränkung in der Bewegung	erhöhte Frequenz, deutliche Abnahme der Bewegung des Tieres	hoch frequente Atmung bis zur Atemnot
<u>Motorik</u>	ohne Defizite	beim Laufen teilweise etwas unkoordiniert	Gang unsicher, schwankend, deutliche Koordinationsdefizite	Lähmungserscheinungen, starke Defizite, Halbseitenlähmung
<u>Körperhaltung</u>	Physiologisch	Rücken leicht gekrümmt (Schonhaltung) oder leicht gesträubtes Fell	Rücken gekrümmt, Fell wirkt struppig	stark gekrümmter Rücken, gesträubtes Fell (zusammengekauert)

3.4 In vivo Methoden

3.4.1 Stereotaktische Implantation

3.4.1.1 Präoperative Vorbereitung und Versuchsaufbau

Die orthotope Implantation fand in einem gesonderten, speziell für chirurgische Eingriffe vorgesehenen Raum statt. Pro Tag wurde einer Versuchsgruppe von neun Tieren einschließlich eines Reservetieres, plus einer Kontrolle implantiert.

Alle benötigten Materialien wurden vor Sedation der Tiere wie folgt aufgebaut:

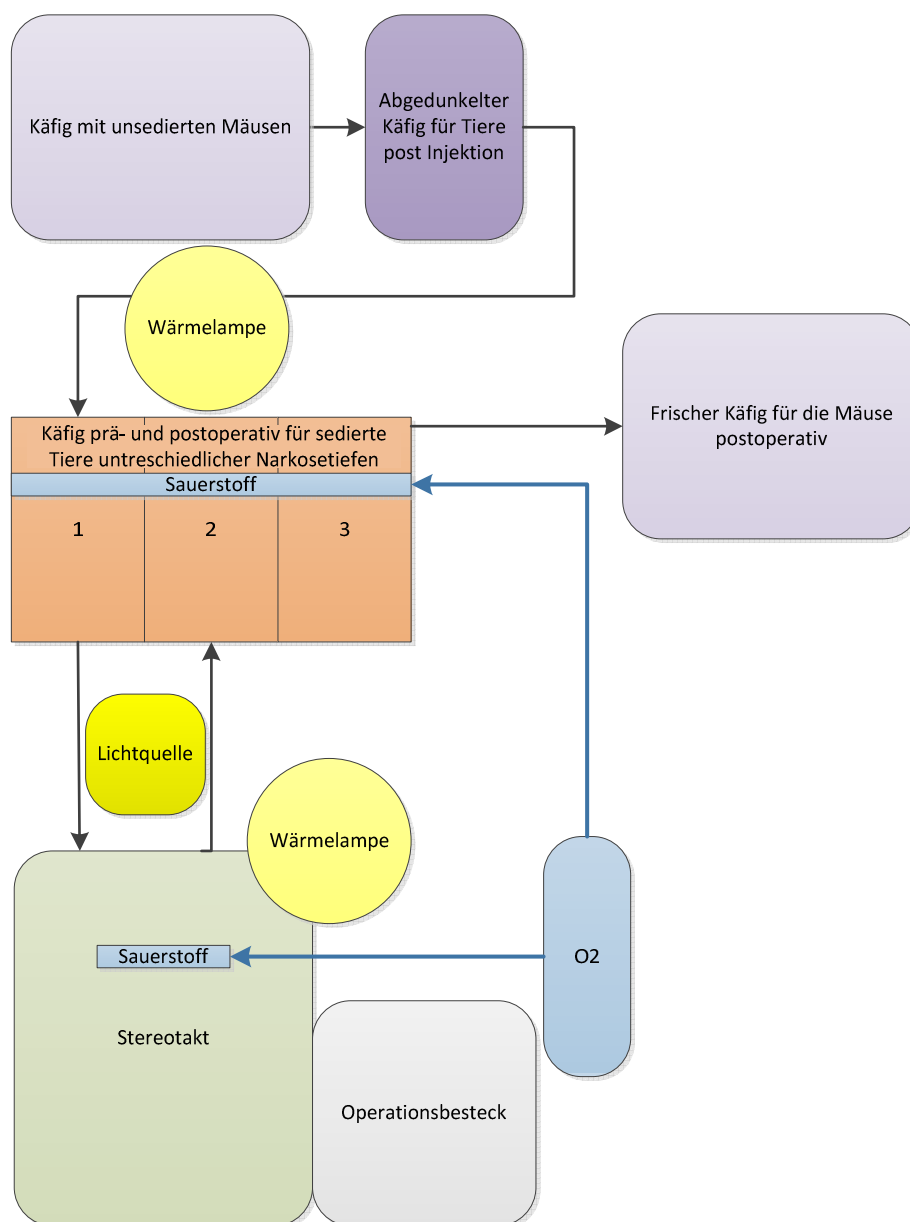


Abbildung 5: Aufbau für die orthotope Implantation

Post Narkose Injektion wurden die Mäuse aus der jeweiligen Gruppe einzeln in einen abgedeckten Käfig gesetzt. Sobald eine leichte Sedierung zu erkennen war, wechselte das Tier in einen in drei Bereiche unterteilten Käfig (s. Abbildung 6). Alle Bereiche wurden mittels Wärmelampe auf einer Temperatur von ungefähr 37°C gehalten und mit zusätzlichem Sauerstoff versorgt. Bereich eins diente als Teil für die Mäuse vor dem Eingriff, Bereich zwei war nach dem Eingriff für Tiere in noch deutlicher Sedation vorgesehen, Bereich drei enthielt alle Tiere, die nach dem Eingriff einen selbstständigen Bewegungsdrang zeigten, aber noch deutliche Koordinationsdefizite aufwiesen.

Sobald die Mäuse wieder bei normalem Habitus waren, wurden diese in einen frischen Käfig gesetzt. Alle Käfige wurden mit sterilem Papier ausgelegt, um ein Verlegen der oberen Atemwege bei den Tieren in der Aufwachphase durch krabbelnde Bewegungen im feinem Einstreu und eine Kontamination der frischen Wunde zu vermeiden.

3.4.1.2 Sedation

Alle Mäuse wurden mittels einer intraabdominalen Injektion sediert. Die verwendeten Narkotika wurden vorher unter sterilen Bedingungen als gebrauchsfertige Lösung angemischt. Verwendet wurden die Sedativa Ketamin 10% als klassisches Anästhetikum, Xylazin 2% als Analgetikum und Acepromazin 1% als Neuroleptika mit stark sedativer Wirkung (Löscher, 2006).

Um das Injektionsvolumen zu erhöhen und dadurch eine einfachere Applikation zu erreichen, wurden die Medikamente mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt.

Tabelle 15: Mischung für insgesamt 3ml Sedation, ausreichend für bis zu neun Tieren

Medikament	Mischung
Ketamin	200µl + 800µl NaCl
Xylazin	200µl + 800µl NaCl
Acepromazin	10µl + 990µl NaCl

Die fertige Mischung ergab 3ml Lösung, die unter gekühlten Bedingungen (+4°C) und dunkel gelagert mehrere Wochen verwendet werden konnte. In diesem Rahmen wurde vor jedem Eingriff die Lösung frisch gemischt und der Behälter – mit Alufolie abgedunkelt und auf Eis gelagert - verwendet. Jedes Tier wurde vor der Injektion kurz beurteilt und gewogen, das Injektionsvolumen richtete sich nach dem Körpergewicht (KGW).

Tabelle 16: Injektionsvolumen der Sedation nach Körpergewicht

KGW in g	Injektionsvolumen
30	0,260
29	0,252
28	0,242
27	0,234
26	0,226
25	0,213
24	0,208
23	0,200
22	0,190
21	0,182
20	0,174
19	0,164

Der Eintritt der maximalen sedativen Wirkung war vollständig nach ungefähr 8-10 Minuten und dauerte mindestens 30 Minuten an. Bei beginnendem Wirkungseintritt erhielt jede Maus 1ml vorgewärmte subkutane NaCl Infusion, Bepanthen Augensalbe und wurde bis zum vollen Eintritt der Wirkung auf eine Wärmeplatte, eingestellt auf 37°C, gelegt. Während der kompletten Sedation wurden die Tiere mit zusätzlichem Sauerstoff versorgt und gewärmt. Die Kennzeichnung erfolgte durch Ohrmarken im rechten Ohr noch vor Umlagerung in den Stereotakten. Die Tiefe der Narkose wurde mit Pinzette im Zwischenzehenbereich nach Tiefensensibilität beurteilt. Zeigte sich eine unzureichende Sedation 10 Minuten post Injektion, wurde 0,05ml intramuskulär nachinjiziert.

3.4.1.3 Implantation

Die Mäuse wurden in Brustlage in einen stereotaktischen Rahmen fixiert. Hierbei wurden die Incisivi maxillaris in eine Bisschiene eingelegt und die Zungen vorgelagert, um eine gute Ventilation der Atemwege zu gewährleisten, und beidseits der Kopf mittels Stiften in Position gebracht.

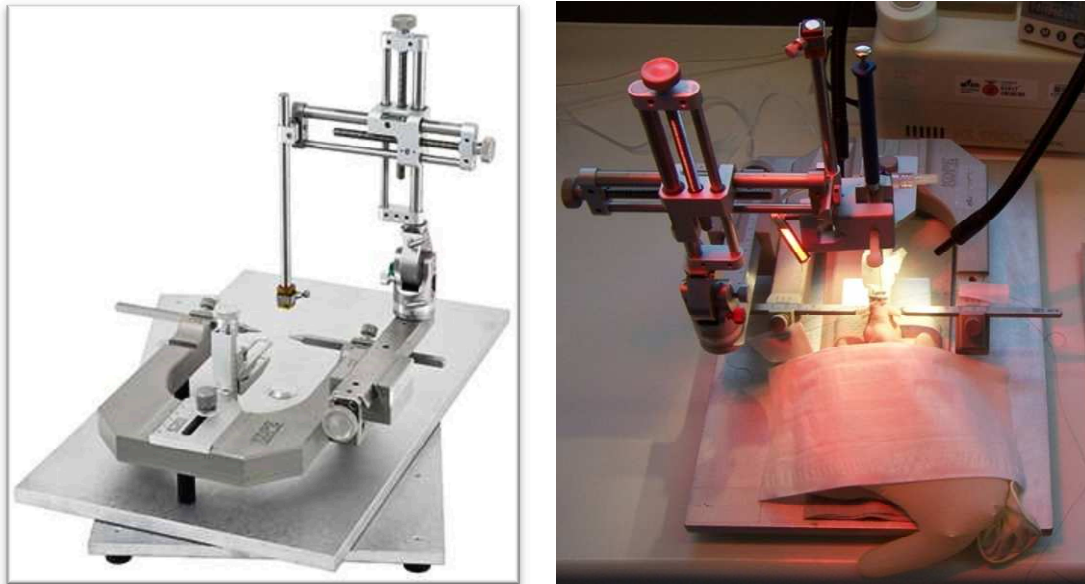


Abbildung 6: links Stereotakt, rechts Maus im Stereotakt gelagert

Der Kopf musste hierbei genau waagerecht gelagert werden, um eine spätere exakte Messung mit senkrechtem Stichkanal zu gewährleisten. Die Maus wurde während der Operation mit einer Wärmelampe, einem warmen Handschuh und Sauerstoff stabil gehalten. Eine leere 10µl Hamilton Spritze wurde in die Halterung des Stereotakten gespannt.

Nach erfolgter Fixation fand eine Desinfektion der Kutis statt, im Anschluss wurde mittels medianer Inzision auf Höhe der Ohrbasis die Kutis eröffnet. Zur besseren Sicht fand ein Wundspreizen durch Fadenzüge und ein Entfernen des Periosts statt.

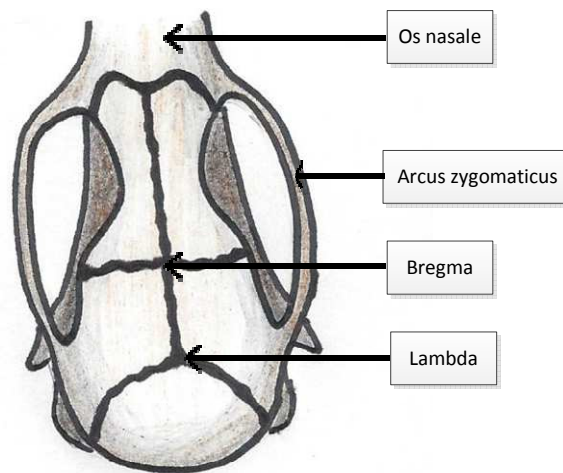


Abbildung 7: Schematische Skizze eines Mausschädels zur Darstellung des Bregma

Ausgehend vom Bregma wurde der Punkt für die Implantation bemessen und markiert. Dabei wurden die dreidimensionalen Koordinaten des Bregma am stereotaktischen Rahmen abgelesen und nach folgenden Angaben rechnerisch korrigiert:

- Anterior-posterior: + 0,5mm
- Medio-lateral: - 1,5mm

An diesem Punkt wurde ein kleines Loch mit einem Zahnbohrer, Diamantkopf 33G, angelegt und der dritte Punkt bemessen sowie korrigiert:

- Dorso-ventral: -2,5mm

Die Spritze wurde mit 2µl der jeweiligen Zellsuspension befüllt und anschließend in die 2,5mm Tiefe im Cauda Putamen injiziert. Die Injektion erfolgte mit einer Rate von 0,25µl pro Minute. Nach vollständiger Injektion wurde die Nadel zwei Minuten in Position belassen und nachfolgend über einen Zeitrahmen von fünf Minuten 0,5mm pro Minute repositioniert, um jegliche Art von Reflux zu vermeiden.

Die Haut über der Injektionsstelle wurde mittels Einzelheften verschlossen und die Maus zurück in die Wärmebox mit Sauerstoff gelegt, bis sie vollständig mobil war.

Der gesamte Eingriff pro Tier umfasste rund 60 Minuten, darunter je nach Tier 8-10 Minuten für die Sedation, 30 Minuten für die Implantation und 15-30 Minuten Aufwachphase.

3.4.1.4 Postoperatives Management

Die Mäuse wurden bis zur vollständigen Regeneration überwacht und versorgt. Eine Wundkontrolle fand in der ersten Woche bei der täglichen Kontrolle der Tiere statt.

3.4.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Bei den 57 Mäusen, die im Rahmen der Hauptversuche implantiert wurden, wurden bei 34 Tieren und bei allen 29 Tieren der Vorversuche *in vivo* Bilder mittels eines 3 Tesla Magnetresonanztomographens (MRT) von Siemens angefertigt. Die Hardware des MRT enthielt ein 4 Phasen Kanal Feld Spulen System für Nagetiere.

3.4.2.1 Vorbereitung des Kontrastmittels

Zur bestmöglichen Darstellung aller Veränderungen wurden die Mäuse in zwei Sequenzen plus zwei Sequenzen mit Kontrastmittel gemessen. Verwendet hierfür wurde Gadovist (Gadobutrol, Gadolinium-Diethylenetriamine Pentaacetic acid: Gd-DTPA), 1,0mmol/ml in verdünnter Lösung. Jede Maus erhielt dabei 0,2mmol/kg Körpergewicht (KGW) Gadovist, entsprechend 0,1ml der angefertigten Lösung intravenös.

Tabelle :17: Kontrastmittel Lösung

Mittel	Menge in ml
Gadovist	0,2
NaCl 0,9%	0,8

Durch die direkte intravenöse Injektion erfolgte eine unmittelbare, vollständige Anflutung intravasal mit einer Clearance von 20 Minuten. Eine Anflutung extravasal war innerhalb der ersten zwei Minuten zu erwarten (Gambarota, 2011).

3.4.2.2 Vorbereitung der Mäuse

Die Tiere wurden am Tag des MRT gruppenweise im Käfig zum MRT transportiert. Vor Ort erfolgte eine kurze Beurteilung der Mäuse. Bei jeder Maus wurde unmittelbar vor Sedation ein intravenöser Zugang in die laterale Schwanzvene gelegt. Hierzu wurde eine Injektionshilfe verwendet, die extra von der physikalischen Werkstatt der Universität Regensburg angefertigt wurde (Abbildung 8). Diese erlaubte, die Mäuse möglichst stressfrei mit freiem Zugang zum Schwanz zu fixieren. Sie bestand aus einer durchsichtigen Röhre, die von den Lumen so gewählt war, dass die Mäuse sich nicht umdrehen konnten. Vor und hinter dem Tier gab es variabel verstellbare, fixierende Wände, die die Röhre verschlossen.

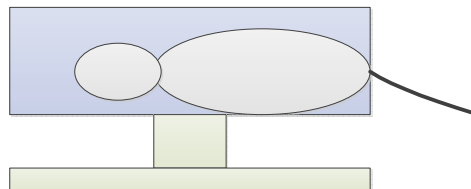


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Injektionshilfe

Sobald das Tier fixiert war, wurde der Zugang in die laterale Schwanzvene gelegt, verwendet wurde eine übliche 28G Braunüle. Die Braunüle wurde vorher mit NaCl gespült. Sobald der Sitz überprüft war, wurde die Braunüle mittels Sekundenkleber und Faden fixiert.

3.4.2.3 Sedation

Eine anschließende Sedation fand durch Inhalationsnarkose in einer Sedationsbox für Nagetiere statt. Verwendet wurde Isofluran zur Anflutung in der Box mit 3-4% und einer Sauerstoffflussrate von 2l/min. Sobald eine deutliche Sedation eintrat, wurde die Ohrmarke entfernt und die Maus in das MRT umgelagert. Dort wurde die Sedation mit Isofluran 0,7% und O₂ 0,8l/min aufrechterhalten.

3.4.2.4 Durchführung

Die Mäuse wurden in das MRT in Bauchlage, die Nase in einer 3ml Spritze zur Narkoseventilation umgelegt. Zur Erhaltung der Körpertemperatur wurde das integrierte Wärmesystem der Spule auf 38°C eingestellt. Mittels einer mit Kontrastmittellösung präparierter Plexusblockade und einer 1ml Spritze wurde am gelegten Zugang alles für die Kontrastmittelgabe vorbereitet, so dass alle Sequenzen ohne direkte Manipulation am Tier erfolgen konnten.

Gemessen wurde kranio-kaudal mit koronarer Schnittebene. Die Messungen wurden mit insgesamt 10 Schnitten je 1mm pro Sequenz vorgenommen. Verwendet wurden die üblichen Wichtungen T2, T1 und T1 mit Kontrastmittel. Bei den ersten Messungen der Vorversuche wurde post Kontrastmittelgabe 20 Minuten gewartet, um ein Anfluten intraneoplastisch zu ermöglichen. Da aber durch die renale Clearance des Gadobutrol zu diesem Zeitpunkt kein Nachweis von Kontrastmittel mehr gelang, wurde dies im Hauptversuch geändert. Dabei wurden umgehend nach Injektion und 10 Minuten später zwei Messungen durchgeführt. Jede Messung mit T1 Wichtung hatte dabei eine Länge von 8:36, sodass eine fast lückenlose Darstellung erfolgen konnte. Insgesamt wurden bei 63 Mäusen jeweils vier Messungen mit je 10 Bildern durchgeführt, bei einer gesamt Scanzeit von 35 Minuten. Die Applikation des Kontrastmittels wurde über die Ver-längerung langsam intravenös injiziert. Die genaueren technischen Daten des MRT wurden von Dr. Deppu R. Pillai übernommen (Pillai, 2011)

Tabelle 17: Modifizierte Sequenzen für das GBM Maus Model nach (Pillai, 2011)

Sequence	T2-TSE	T1-SE
TR (ms)	4000	1000
TE (ms)	68	18

Nach der letzten Messung erfolgte ein sofortiges Umlagern des Tieres in eine Aufwachbox. Die Tiere wurden innerhalb von 24 Stunden nach dem MRT mittels kardialer Perfusion beendet.

3.4.3 Kardiale Perfusion

Zur Fixation der Gewebeproben wurde die kardiale Perfusion verwendet. Diese auch als direkte Perfusion bezeichnete Fixation nutzt das vorhandene Gefäßsystem des Gewebes, um das Medium schnellstmöglich in alle Regionen des Körpers zu bekommen. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass durch die schnelle, feine Perfusion des Gewebes inklusive der Endstrombahnen und das schnelle Stoppen der Stoffwechselvorgänge maximale Ergebnisse erzielt werden. Alternativ bestand die Möglichkeit einer Immersions-Fixation, hierbei muss das fixierende Medium von außen das komplette Gewebe durchdringen, dabei sollten nur möglichst kleine Proben verwendet werden, um ein schnelles gleichmäßiges Durchdringen zu gewährleisten. In der Literatur findet man hierzu Angaben von maximal 0,5 bis 1cm Durchmesser.

Da bei der Perfusion histologisch deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden können und in dieser Arbeit das gesamte Gehirn fixiert wurde, wurde die kardiale Perfusion als Fixationsmethode verwendet.

Hierfür wurde im Vorfeld 4% PFA vorbereitet und im Kühlschrank über Nacht verwahrt (Tabelle 19). Das zu diesem Zweck benötigte 0,9% NaCl wurde als fertige Infusionslösung (Firma Braun) verwendet.

Tabelle 18: Ansatz für 1 Liter 4% PFA

Chemikalien	Menge
NaH₂PO₄	5,52g
Na₂HPO₄	28,48g
Destilliertes Wasser	500ml
NaOH	1-2ml
0,2M PBS	500ml
Kristallines PFA	40g

NaH₂PO₄: Natriumdihydrogenphosphat, Na₂HPO₄: Dinatriumhydrogenphosphat, NaOH: Natronlauge, PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, PFA: Paraformaldehyd

3.4.3.1 Perfusionsaufbau

Zur Vorbereitung der Perfusion wurden an einem Dreiwegehahn eine Flasche 0,9 % NaCl und die am vorherigen Tag vorbereitete PFA-Lösung angeschlossen. Zur Instillation wurde das herkömmliche Butterfly System 26G verwendet. Beide Flaschen wurden mittels Infusionsständer aufgehängt und das Infusionsbesteck einmalig mit der jeweiligen Lösung durchgespült. Das Infusionsbesteck wurde auf 1 Tropfen alle 1,5 Sekunden eingestellt. Die Infusion wurde anschließend im unteren Bereich mittels Arterienklemme verschlossen und der Dreiwegehahn auf Durchfluss von beiden Flaschen gestellt. Im unteren Teil der Verlängerung nach dem Dreiwegehahn befand sich nur noch NaCl, aber kein PFA mehr. Unter einer Abzugshaube im Tieroperationsraum fanden die Perfusionen im Anschluss statt, zur Fixation der Tiere und zum Auffangen von Flüssigkeiten wurde ein Gitterkäfig verwendet. Auf dem Gitter lag eine Styroporplatte zur Fixation der Tiere.

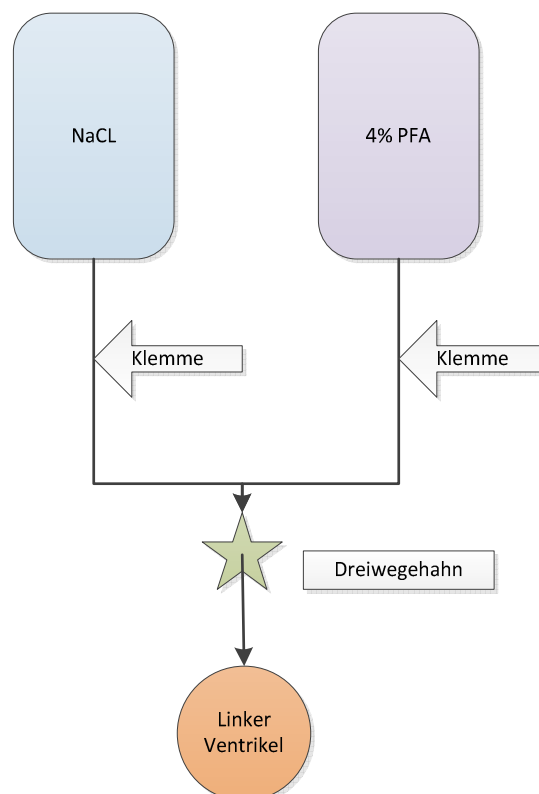


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Perfusionsaufbaus

3.4.3.2 Sedation

Bei der Perfusion wird das Tier durch Hyperperfusion beendet. Die Tiere wurden hierfür tief irreversibel sediert. Für eine optimale Verteilung des PFA ist eine eigenständige Herzkontraktion notwendig, daher wurde der Eingriff im Übergang des Stadium III-2 zu III-3/ IV, eingeteilt nach Guedel (Guedel, 1951) durchgeführt (Abbildung 10). Somit war gewährleistet, dass die Tiere zum Zeitpunkt des Eingriffes schmerzfrei, jedoch noch weitestgehend Kreislauf stabil waren.

Die Sedation umfasste ein Injektionsvolumen von durchschnittlich 0,3ml pro Tier.

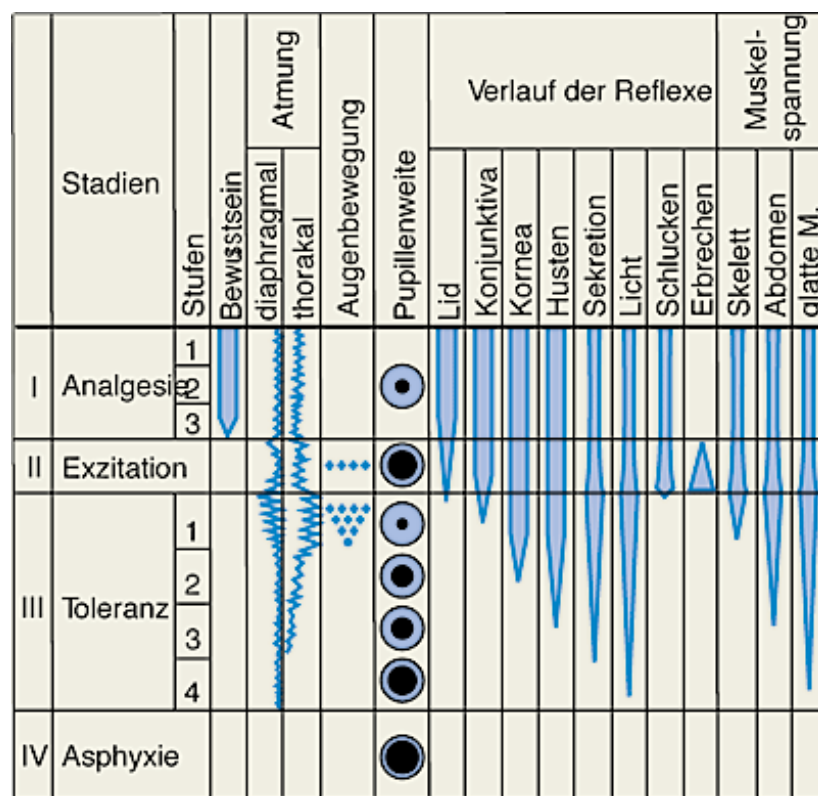


Abbildung 10: Narkosestadien nach Guedel AE (Quelle: gesundheit.de)

3.4.3.3 Durchführung

Zum eigenen Schutz vor der Inhalation von PFA wurde während der Operation zusätzlich zu den vorgeschriebenen Schutzmaßnahmen im Tierstall noch ein Mundschutz verwendet.

Die Tiere wurden intramuskulär sediert und nach negativem Test der Tiefsensibilität in Rückenlage auf dem Styropor fixiert. Hierbei erfolgte die

Fixation mittels Kanülen. Das Abdomen wurde kaudal des Sternums eröffnet. Zusätzlich wurde mittels einem von dort nach kranial führend, U-förmigen Schnitt der Thorax, nach Möglichkeit unter Schonung der Arteria Thoracica und Vena Thoracica, eröffnet. Der entstandene Thorax Lappen wurde nach kranial gelagert. Die Herzspitze wurde mittels einer kleinen Arterienklemme vorsichtig fixiert und der linke Ventrikel mit einer Butterflykanüle penetriert. Die Kanüle wurde im Anschluss mit der Arterienklemme intrakardial in Position gehalten. Sobald der Sitz überprüft war, konnte die Klemme der Natriumchlorid Infusion gelöst und unmittelbar im Anschluss das Auricula atrii dextra (rechtes Herzohr) mittels eines Scherenschlages eröffnet werden.

Durch die Infusion wurde mit physiologischem intravasalen Druck nun das gesamte Gefäßsystem fünf Minuten mit der sterilen Kochsalzlösung gespült. Sobald alle Gefäße blutleer waren und eine klare Lösung aus dem Auricula atrii floss, wurde die Klemme der PFA Lösung gelöst und das Gefäßsystem fünf Minuten mit PFA gespült. Schon nach wenigen Sekunden erfolgte eine sichtbare Fixation des Körpers, bei der überwiegend ein kurzer Muskeltonus der Gliedmaßen zu beobachten war.

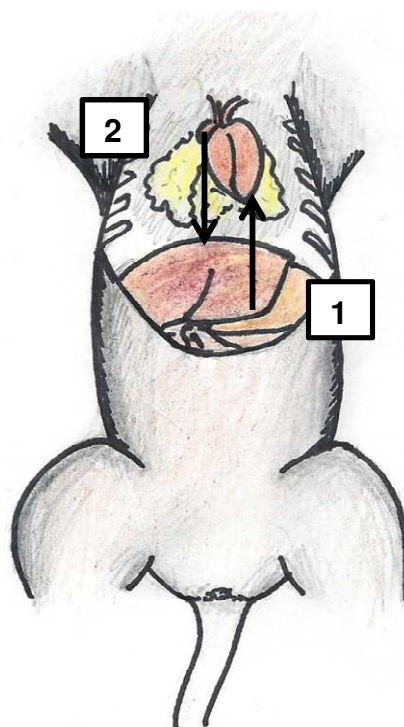


Abbildung 11: Schematische in situ Ansicht der Mäuse in situ während der kardialen Perfusion:
Flußrichtung durch linken Ventrikel (1) über den gesamten Kreislauf bis zum rechten Auricula atrii (2)

Insbesondere wurde bei dieser Methode neben dem Sitz der Kanüle vor allem die Infusionsrate monitoriert, um Schäden im Gewebe zu vermeiden. Ein zu schneller Fluss erzeugt einen zu hohen intravasalen Druck und verursacht einen erhöhten Austritt von Flüssigkeit in den Kapillaren; es kommt zu einer Hyperperfusion des extravasalen Gewebes. Diese führt zu histologisch sichtbaren Schäden am Präparat. Eindeutiger Hinweis hierfür ist ein sich bildendes Lungenödem, makroskopisch sichtbar an einem Aufblähen der kollabierten Lungenlappen, bis hin zum Austritt von Flüssigkeit nasal.

Insgesamt wurden 81 Tiere perfundiert, jede Perfusion dauerte durchschnittlich jeweils 25 Minuten.

3.4.3.4 Präparation des Gehirns

Unmittelbar nach Beendigung der Tiere mittels Perfusion wurde das Gehirn entfernt und nochmals 24 Stunden in der 4%PFA Lösung bei 7°C in einem herkömmlichen Kühlschrank belassen.

Zur Eröffnung des Schädels wurde mittels Scherenschlag die Haut dorsal eröffnet. Von kaudal konnte dann vorsichtig mithilfe einer schmalen Knochenzange ins Foramen Magnum eingegangen und über das Os Occipitale nach kranial Richtung Os Frontale präpariert werden. Nach Abheben der dorsalen Schädeldecke wurden mittels abgerundeten Spatel die Nervi Optici vorsichtig durchtrennt, der Spatel unter das Gehirn geschoben und nach kaudal herausgehoben. Dabei wurde unter Schonung des Bulbus Oculi gearbeitet und zum Schutz des Cerebellum ein Teil der Medulla oblongata mitpräpariert.

Aufgrund der großen Zahl der Präparate wurden die Gehirne bei -80°C vor der Weiterverarbeitung eingefroren. Daher erfolgte zum Schutz des Gewebes nach der 24-stündigen Lagerung in PFA noch eine 24-stündige Immersions-Perfusion zur Kälteprotektion mittels 30% Sucrose bis zur vollständigen Sättigung des Präparats. Sucrose, auch Saccharose genannt, ist ein kristalliner Zucker, der in herkömmlichem, destilliertem Wasser gelöst wird, bis eine 30%-Lösung entsteht. Eine Sättigung der Präparate dient zur dehydrierenden Kryoprotektion des Gewebes.

3.5 Aufarbeitung des Gewebes

3.5.1 Kryokonservierung, Einfrieren nach Johnson

Bei dem Verfahren nach Johnson (Johnson, 2010) wird das Gewebe extrem schnell eingefroren. Zusammen mit der vorher verwendeten Sucrose werden so Schäden durch das Einfrieren, die zu Artefakten führen, vermieden. Das verwendete Methylbutan wurde auf -80°C gebracht und dann anschließend mit dem Trockeneis weiter gekühlt. Das Gehirn wurde mithilfe eines Spatels vorsichtig aus dem Behälter mit Sucrose entnommen, abgetropft und auf Alufolie gelegt.

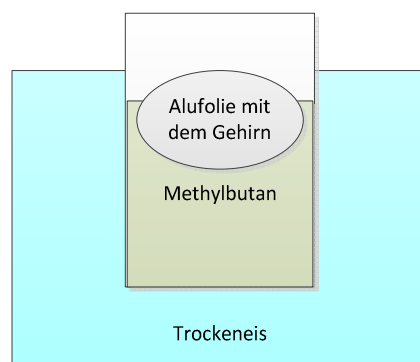


Abbildung 12: Aufbau, Einfrieren nach Johnson

Im Anschluss wurde dieses mit den unteren Anteilen in das Methylbutan gehalten, innerhalb von 60 Sekunden fand ein vollständiges Einfrieren statt. Die Folie diente dabei als Kälteleiter und Schutz vor direkten Kontakt zum Methylbutan.

Das Aufbewahren der Proben bis zur Weiterverarbeitung fand in einem herkömmlichen -80°C Gefrierschrank statt.

3.5.2 Gefrierschnitte

Verwendet wurde ein Gefriermikrotom, Leica CM 1950 mit einer R35 Feather-Klinge. Je Gehirn wurden 200 Schnitte in kranio-kaudaler Führung, identisch zu der Schnittebene des MRT angefertigt. Die Schnittdicke betrug $12\mu\text{m}$. Die bei -80°C gefrorenen Proben wurden auf den Probenhalter mittels Tissue Tec aufgebracht und über die Schnell-Gefrier-Position unverzüglich fixiert. Im Anschluss wurde das Gehirn für ca. 20 Minuten im Mikro-

tom gelagert und so auf die Schnitttemperatur von 20-25°C gebracht. Die Kammertemperatur wurde je nach Außentemperatur eingestellt und betrug durchschnittlich -20°C, die Einstellung des Trägers war -20°C bis -25°C. Verwendet wurden Leica super Frost plus Objektträger. Pro Objektträger wurden 2 Schnitte aufgezogen mit jeweils 10 Schnitten Abstand. Somit befanden sich beispielsweise auf dem Objektträger 1, Schnitt 1 und 11, auf dem Objektträger 2, Schnitt 2 und 12. Die Schnitte wurden soweit möglich direkt von der Klinge auf den Objektträger gebracht und nur bei Bedarf mittels Pinsel manipuliert.

Es wurden pro Mäusegehirn in den Hauptversuchen 200 Schnitte auf 100 Objektträger aufgezogen. Bei den Vorversuchen wurden dabei bei 29 Tieren 2.900 Schnitte auf 1.450 Objektträger aufgebracht (pro Tier 100 Schnitte auf 50 Objektträgern). Bei den Hauptversuchen mit 48 Mäusen insgesamt 9.600 Schnitte angefertigt und auf 4.800 Objektträgern aufgezogen. Während des gesamten Schneidevorgangs wurden alle Proben gekühlt auf Schmelzeis oder im Mikrotom aufbewahrt. Die fertigen Schnitte wurden umgehend in Setzkästen in den -80°C Gefrierschrank umgelagert.

3.5.3 Färbungen

3.5.3.1 Hämalaun-Eosin

Als Basisfärbung wurde die gängige Hämalaun-Eosin (HE) Färbung verwendet. Die HE Färbung ist weltweit die verbreitetste Routinemethode in der Pathologie und kann generell bei jedem Präparat angewendet werden. Mithilfe der aus den beiden Komponenten Eosin und Hämalaun bestehenden Färbungen dient sie zur Übersicht von Feinschnitten. Der basophile Hämalaun färbt dabei überwiegend die negativ geladenen Phosphatgruppen, wie den Zellkern und das raue endoplasmatische Retikulum, blauviolett an. Eosin hingegen färbt die eosinophilen Strukturen. So stellen sich das Zellplasma, das glatte endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien überwiegend rötlich dar (Welsch, 2011). Von jedem Gehirn wurde zur Übersicht jeder zehnte Schnitt mittels der HE-Schnellfärbung für Gefrierschnitte nach Prof. Dr. F. Hofstädter gefärbt.

Die benötigten Reagenzien wurden wie folgt angesetzt:

Tabelle 19: Ansetzten der Hämalaunlösung

Reagenz	Menge
Hämatoxylin	2g
Aqua dest.	2000ml
Natriumjodat	0,4g
Aluminiumkaliumsulfat	100g
Chloralhydrat	100g
Zitronensäure	2g

Tabelle 20: Ansetzten der Eosinlösung

Reagenz	Menge
Eosin-G-Pulver	10g
50% Isopropanol	1l
100% Essigsäure	1ml

Die oben aufgeführten Lösungen wurden in einem Erlenmeyerkolben der Reihe nach (Tabelle 20 und 21) angesetzt. Alle kristallinen Pulver wurden mittels Magnetrührverfahren solange vermischt, bis eine Lösung entstand. Diese wurde im Anschluss durch einen herkömmlichen Filter in geschlossene lichtgeschützte Behälter umgefüllt. Das verwendete 100% Isopropanol wurde in zwei verschiedenen Verdünnungen zu 70% und 96% angemischt und ebenfalls in geschlossene Behälter gefüllt. Zum Färben der Schnitte wurde mit einem Mehrkammersystem unter einem Dunstabzug gearbeitet. Das Protokoll umfasste neun Schritte (Tabelle 22).

Tabelle 21: Färbeprotokoll HE

HE Färbeprotokoll	
Hämalaun	2 Minuten
Leitungswasser	1 Minute, „bläuen“
Eosin	2 Sekunden
Leitungswasser	Spülen
Isopropanol 70%	2 mal 5 Sekunden
Isopropanol 96%	2 mal 5 Sekunden
Isopropanol 100%	2 mal 5 Sekunden
Neo Clear	2 mal 5 Sekunden

Das sogenannte „Bläuen“ erfolgt durch eine pH Erhöhung bei dem Spülen mittels Leitungswasser, dies führt dazu, dass die vorher bräunliche Lösung ihre bläuliche Farbe entwickelt. Zwischen jedem Schritt wurde den Objektträgern 8 Sekunden Zeit gewährt, um abzutropfen. Nach der entwässernden aufsteigenden Alkoholreihe und dem abschließenden Waschen in Neo Clear erfolgte direkt ein Eindeckeln der Präparate mittels Neo Mount unter einem herkömmlichen Deckgläschen.

Insgesamt wurde von jedem Tier jeder zehnte Schnitt mit HE gefärbt. Es wurden bei den Vorversuchen 145 Objektträger mit 290 Schnitten gefärbt und ausgewertet. Bei den Hauptversuchen wurden 480 Objektträger mit 960 Schnitten HE gefärbt und ausgewertet.

3.5.3.2 Immunhistologische Färbungen

Das Ziel der Färbungen war es, die induzierten Tumore eindeutig dem Ursprungstumor zuzuordnen und gegebenenfalls auftretende Differenzierungen der Zellen in Kultur durch ihr *in vivo* Verhalten festzustellen. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die Tumore der mit BTIC implantierten Tiere dem Ursprungs GBM entsprechen.

Alle immunhistologischen Färbungen wurden von Frau Maria Hirblinger, Abteilung für Neuropathologie am Uniklinikum Regensburg (Leiter: Professor Dr. Riemenschneider), angefertigt. Dabei wurden STAT3, Nestin und CEBP- β nach dem Protokoll „DakoCytomation En Vision+ Dual Link System-HRP (DAB+)“ gefärbt (Tabelle 23). SOX2 wurde mit dem „Goat Kit Santa Cruz“ der Firma ImmunoCruz angefärbt und alle übrigen Färbungen in der Routine Abteilung nach Standardprotokoll vollautomatisch hergestellt.

Tabelle 22: Allgemeines Protokoll für immunhistologische Färbungen nach DakoCytomation

Arbeitsgang	Zeit in Minuten
Endogene-Enzym-Hemmer	10 Minuten
Spülen, Pufferbad	
Primärer Antikörper oder negativ Kontrolle	40 Minuten
Spülen, Pufferbad	
Sekundärer Antikörper	30 Minuten
Spülen, Pufferbad	
Substratchromogenlösung	5-10 Minuten
Spülen	
Hämatoxylin	4 Minuten
Spülen mit heißem Wasser	
Aufsteigende Ethanol Reihe	Jeweils 2 x 2 Minuten
Eindeckeln mit Entellan	

Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Vorversuche

Bei den Vorversuchen wurden sieben Tumorzelllinien und eine Zelllinie der neuralen Vorläuferzellen orthotop bei 25 Tieren implantiert und nach 12 Wochen nach der Durchführung eines MRT beendet.

Insgesamt konnte bei keiner der Mäuse, die mit neuralen Vorläuferzellen implantiert wurden, ein Tumorwachstum, auch Tumortake genannt, festgestellt werden. Bei den insgesamt 21 mit BTIC implantierten Mäusen wurde bei 14 Tieren ein Tumor festgestellt.

Tabelle 23: Übersichtstabelle über Untersuchungsergebnisse der Vorversuche

Zellen	Zellzahl	Tierzahl	Anzahl positiver Ergebnisse	
			MRT	Histologie
NPC	10.000	3	0	0
BTIC	10.000	21	9	14

Implantation mit jeweils 10.000 Zellen bei neuralen Vorläuferzellen (NPC: neural stem cells) und Hirntumor initiiierende Zellen (BTIC)

Im Laufe der ersten Gruppen wurden die Verfahren der Implantation sowie die Durchführung des MRT weiter etabliert. Bei der Implantation konnte insbesondere der Ablauf und die Narkosesicherheit verbessert werden. Beides wurde in den Hauptversuchen weiter an die verwendeten Nacktmäuse angepasst. Die Mortalität während des Eingriffes lag am Ende bei 0%. Bei den bildgebenden Verfahren wurde das MRT so angewendet, dass in allen Sequenzen eine gute Beurteilung der MRT Bilder erfolgen konnte. Dies wurde insbesondere durch Lagerung und Änderung der Messungsparameter (siehe (Pillai, 2011)) erreicht.

Zusätzlich wurde noch das erarbeitete Punktesystem zum Monitoring des Gesundheitsstatus der Tiere während der Versuchsdauer etabliert. Das System ermöglichte eine schnelle umfassende Beurteilung des Status jeder Maus. Es konnte festgestellt werden, dass es nur bei Tieren mit hochgradigem Tumor am Ende der Versuchszeit, parallel zur Gewichtsreduktion, leichte Veränderungen in Habitus, Körperhaltung, Verhalten und neuro-

logische Auffälligkeiten gab. Davor gab es keine versuchsinduzierte Belastung der Tiere außerhalb der einzelnen Eingriffe.

Nach dem Abschluss und der Auswertung der Vorversuche wurde aufgrund des invasiveren und für GBM typischeren Wachstums der RAV 39 für diese Zelllinie entschieden, die anderen Linien mit gutem Tumorwachstum zeigten, neben eines zwar teils massiveren Wachstums, ein eher solitäres, teils abgekapseltes Bild.

4.2 Ergebnisse der Hauptversuche

Insgesamt wurden in den Hauptversuchen 27 Tiere mit undifferenzierten RAV 39 Zellen BTIC implantiert, hiervon verstarben zwei Tiere perakut und konnten nicht ausgewertet werden. In der Gruppe BTIC I, bestehend aus acht Tieren, wurden 1000 Zellen implantiert. In dieser Gruppe konnte bei 62,5% der Tiere, also bei fünf Tieren, ein Tumor nachgewiesen werden, hiervon vier im MRT und fünf histologisch. In der Gruppe BTIC II, welche mit 10.000 Zellen implantiert wurden, brachten neun Mäuse auswertbare Ergebnisse. Tumorzellen konnten hier bei vier Tieren histologisch nachgewiesen werden und hiervon bei zwei auch im MRT. Gruppe BTIC III bestand aus acht Tieren; welchen je 100 Zellen implantiert wurden. Hier wurde im MRT bei einer Maus und histologisch bei insgesamt vier Tieren ein Tumorwachstum festgestellt.

Bei den TC-Gruppen I, II und III konnte bei jeweils sieben, acht und acht Tieren je 10.000, 1.000 und 100 differenzierte RAV-39 Zellen eine Auswertung erfolgen. In den beiden Gruppen mit 1.000 und 10.000 Zellen konnte histologisch bei einer Maus ein Tumorwachstum nachgewiesen werden. In der Gruppe ~~(eins)~~ I war das Tumorwachstum bei diesem Tier ebenfalls nur histologisch nachweisbar.

In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Untersuchungen, unterteilt nach Gruppe, Untersuchungsmethode und implantierter Zellzahl, zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse aller 6 Gruppen bei den jeweiligen Untersuchungsmethoden

Gruppen		Zellzahl	Tierzahl	Anzahl positiver Ergebnisse	
				MRT	Histologie
BTIC	I	1.000	8	4	5
	II	10.000	9	2	4
	III	100	8	1	4
TC	I	10.000	7	0	1
	II	1.000	8	0	1
	III	100	8	0	0

Aufgrund der Änderung der Mäuse von den NOD SCID zu den NMRI nu/nu Tieren stellte sich bei den ersten Implantationen die Schwierigkeit dar, die Kreislauf labileren nude Mäuse stabil zu halten. Bei den ersten Eingriffen verstarben 15% der Tiere aufgrund von Kreislaufversagen. Nach dem ersten Eingriffstag konnte durch Infusion, Sauerstoff- und Wärmezufuhr die Mortalität auf 0% gesenkt werden.

4.3 Bildgebende Verfahren (MRT)

Die folgenden Tabellen zeigen die Auswertung des durchgeführten MRT. Das MRT wurde bei den Tieren nach Möglichkeit vor Beendigung der Tiere gefahren.

Die Auswertung der MRT Bilder wurde durch die Betrachtung aller 4 Sequenzen (T2, T1 und T1 mit Kontrastmittel unmittelbar und nach 10 Minuten) durchgeführt. Hierbei wurden die Bilder wie folgt bewertet:

Tabelle 24: Auswertungsschlüssel MRT

Abkürzung	
-/-	Kein Tumorverdacht
-/+	Unklares Areal
+	Verdächtiges Areal
++	Starker Tumorverdacht
+++	Hochgradiger Tumorverdacht

Die Ergebnisse der bildgebenden Verfahren wurden am Ende im Zusammenhang mit den histologischen Ergebnissen gesetzt, um die Sensitivität des Verfahrens zu bestimmen.

4.3.1 Vorversuche

Im Vorversuch wurden alle Tiere mit 10.000 Zellen implantiert. Die Tabelle 27 zeigt die Auswertung der rein bildgebenden Untersuchungen mit dem zur Verfügung stehenden 3 Tesla MRT.

Es wurden nach MRT neun Tiere als wahrscheinliche Tumore bewertet, vier als unklar und sechzehn als negativ befundet. Hiervon wurden die vier als unklar eingeteilten Mäuse bei den späteren Untersuchungen als Tumor negativ beurteilt. Es wurden keine Tiere falsch negativ befundet.

Tabelle 25: Tumortake nach bildgebenden Verfahren bei den Vorversuchen

Mäuse Vorversuche	Zellen	MRT T2	MRT T1	MRT T1 mit Kontrastmittel
BTM 19	RAV 20	++	++	+
BTM 20	RAV 20	-	-/+	-
BTM 21	RAV 20	++	++	+
BTM 22	RAV 20	+	+	+
BTM 23	RAV 20	+	+	+
BTM 24	RAV 20	+++	+++	++
BTM 25	Kontrolle	-	-	-
BTM 26	FB 6	-	-	-
BTM 27	FB 6	-	-	-
BTM 28	FB 6	-	-	-
BTM 29	RAV 21	-	-	-
BTM 30	RAV 21	-	-	-
BTM 31	RAV 21	-	-	-
BTM 32	Kontrolle	-	-	-
BTM 33	RAV 19	-	-	-
BTM 34	RAV 19	-	-	-
BTM 35	RAV 19	+/-	+/-	-
BTM 36	RAV 39	++	++	++
BTM 37	RAV 39	+	+	+
BTM 38	RAV 39	+	+	+
BTM 39	Kontrolle	-	-	-
BTM 40	RAV 17	+/-	+/-	-
BTM 41	Kontrolle	-	-	-
BTM 42	RAV 17	+/-	+/-	-
BTM 43	RAV 17	+	+	+
BTM 44	RAV 28	-	+/-	-
BTM 45	RAV 28	-	-	-
BTM 46	RAV 28	-	-	-
BTM 47	RAV 28	+/-	+/-	-

-: kein Verdacht, +/-: unklares Areal, +: Tumorverdacht, ++: großer Tumor, +++: sehr großer Tumor

Abbildung 13 und Abbildung 14 zeigen zwei verschiedene Tiere mit deutlich positivem MRT Befund. Dabei ist zu beachten, dass die Mäuse mit gleicher Zellzahl unterschiedlicher Zelllinien an identischer Stelle implantiert wurden. Bei allen Tieren zeigt sich trotz deutlichen Tumors keine Kontrastmittelanreicherung.

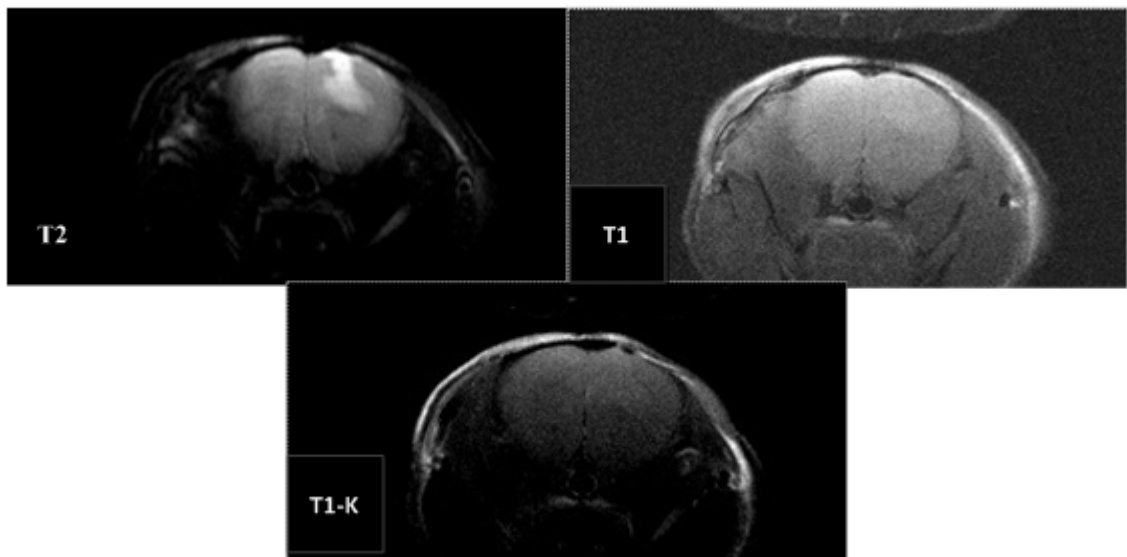


Abbildung 13: Beispiel einer Maus (RAV 39) mit hochgradigen Tumorverdacht: großes hyperintenses Areal bei der T2 Wichtung, kaum sichtbare Veränderung bei der zweiten Sequenz (T1) und keine sichtbare Kontrastmittelanreicherung bei der letzten Messung

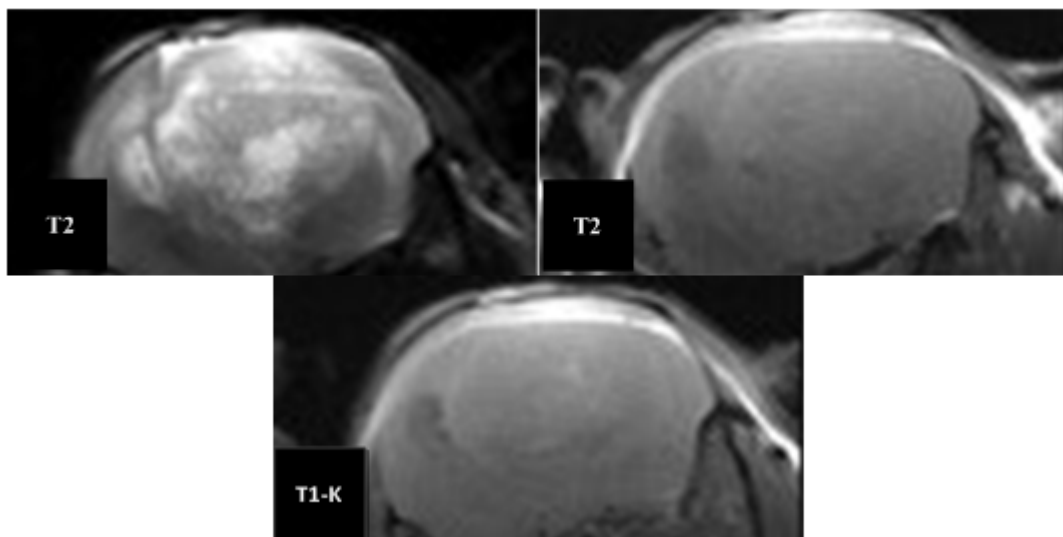


Abbildung 14: Beispiel einer Maus (RAV 20) mit hochgradigen Tumorverdacht: großes hyperintenses, inhomogenes Areal bei der T2 Wichtung, Verdrängung der linken Hemisphäre, sichtbare Veränderung bei der zweiten Sequenz (T1) und keine sichtbare Kontrastmittelanreicherung bei der letzten Messung

4.3.2 Hirntumor initiiierende Zellen und Tumorzellen

Bei den Hauptversuchen wurden die vorher etablierten Verfahren der Vorversuche verwendet. Aufgrund von akuten bis perakuten Verschlechterungen der Gesundheit mancher Tiere war die Durchführung des MRT nicht in allen Fällen möglich, diese wurden hierbei mit n.d. (nicht durchgeführt) bezeichnet.

4.3.2.1 Hirntumor initiiierende Zellen

Insgesamt wurden bei den BTIC implantierten Tieren bei 18 ein MRT durchgeführt. Hiervon wurden zwei Tiere als positiv bewertet, fünf als verdächtig und 11 als negativ. Bei den als negativ befundeten Tieren wurde später bei drei weiteren ein kleiner Tumor festgestellt, ein Tier wurde als falsch positiv bewertet und sieben, bei denen ein Tumor gefunden wurde, wurden nicht im MRT beurteilt.

Tabelle 26: Tumortake nach bildgebenden Verfahren bei den undifferenzierten Tumorzellen

Mäuse BTIC (RAV 39)	Zellzahl	MRT T2	MRT T1	MRT T1 mit Kontrastmittel
1	1.000	+/-	+/-	-
2		n.d.	n.d.	n.d.
3		++	+	+
4		+/-	-	-
5		n.d.	n.d.	n.d.
6		n.d.	n.d.	n.d.
7		+	+/-	+/-
8		n.d.	n.d.	n.d.
9		n.d.	n.d.	n.d.
10	Kontrolle	-	-	-
11	10.000	-	-	-
12		+/-	-	-
13		-	-	-
14		n.d.	n.d.	n.d.
15		n.d.	n.d.	n.d.
16		-	-	-
17		+/-	+/-	+/-
18		-	-	-
19		-	-	-
20	Kontrolle	-	-	-
21	100	n.d.	n.d.	n.d.
22		n.d.	n.d.	n.d.
23		-	-	-
24		-	-	-
25	100	n.d.	n.d.	n.d.
26		-	-	-
27		n.d.	n.d.	n.d.
28		+/-	-	-
29	100	n.d.	n.d.	n.d.
30		-	-	-

-: kein Verdacht, +/-: unklares Areal, +: verdächtiges Areal, ++: starker Tumor Verdacht, +++: hochgradiger Tumor Verdacht, n.d: nicht durchgeführt

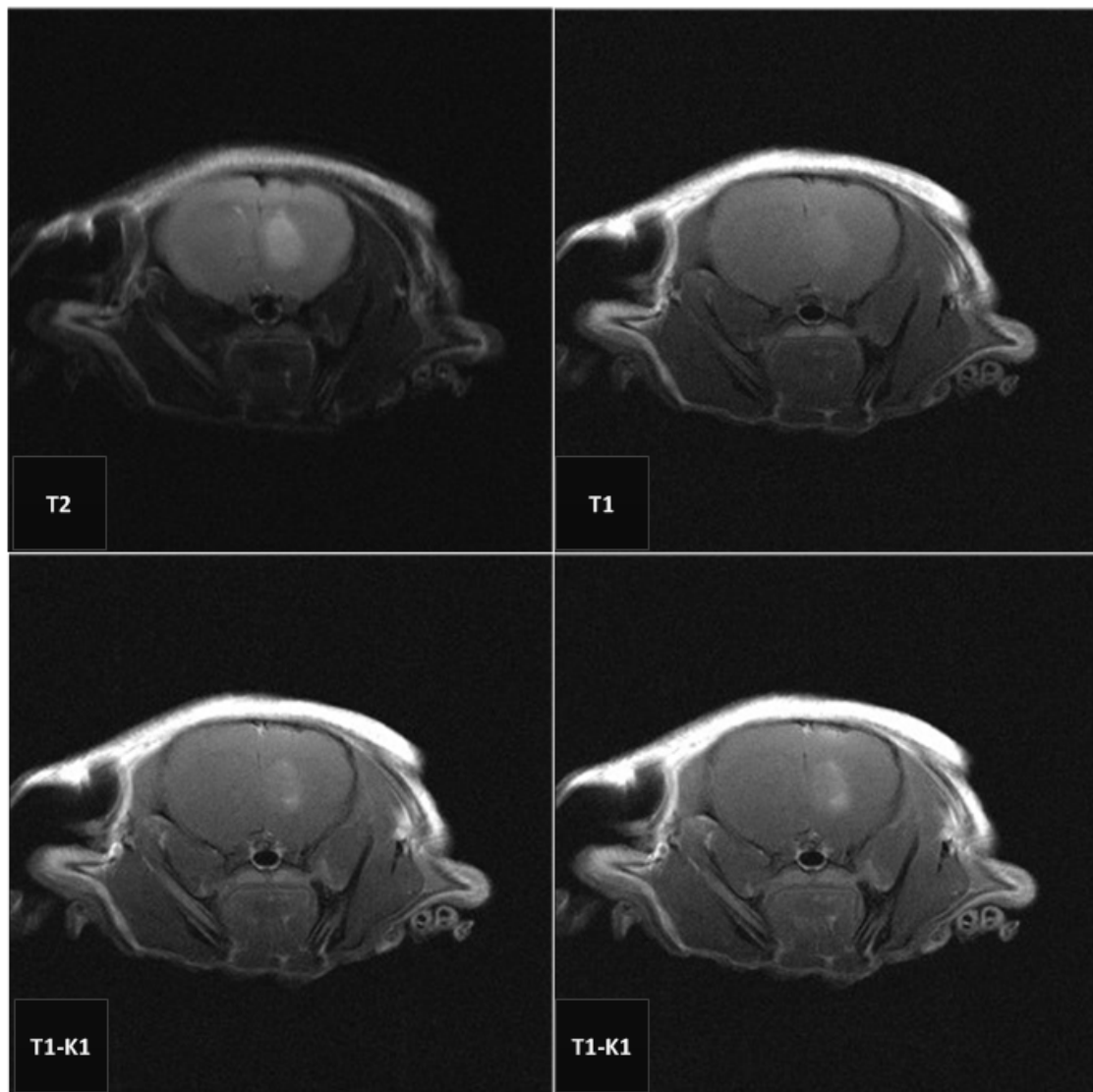


Abbildung 15: Beispiel einer Maus mit eindeutigem, hochgradigem Tumor: deutlich hyperintenser Bereich an der Implantationsstelle und positiver Kontrastmittelanreicherung mit T1 Wichtung. Gut sichtbar auch die Verstärkung des Signals von der ersten Kontrastmittelsequenz zur zweiten durch weitere Anreicherung (T1-K1: unmittelbar nach Kontrastmittelgabe, T1-K2: 8:36 Minuten nach Kontrastmittelgabe).

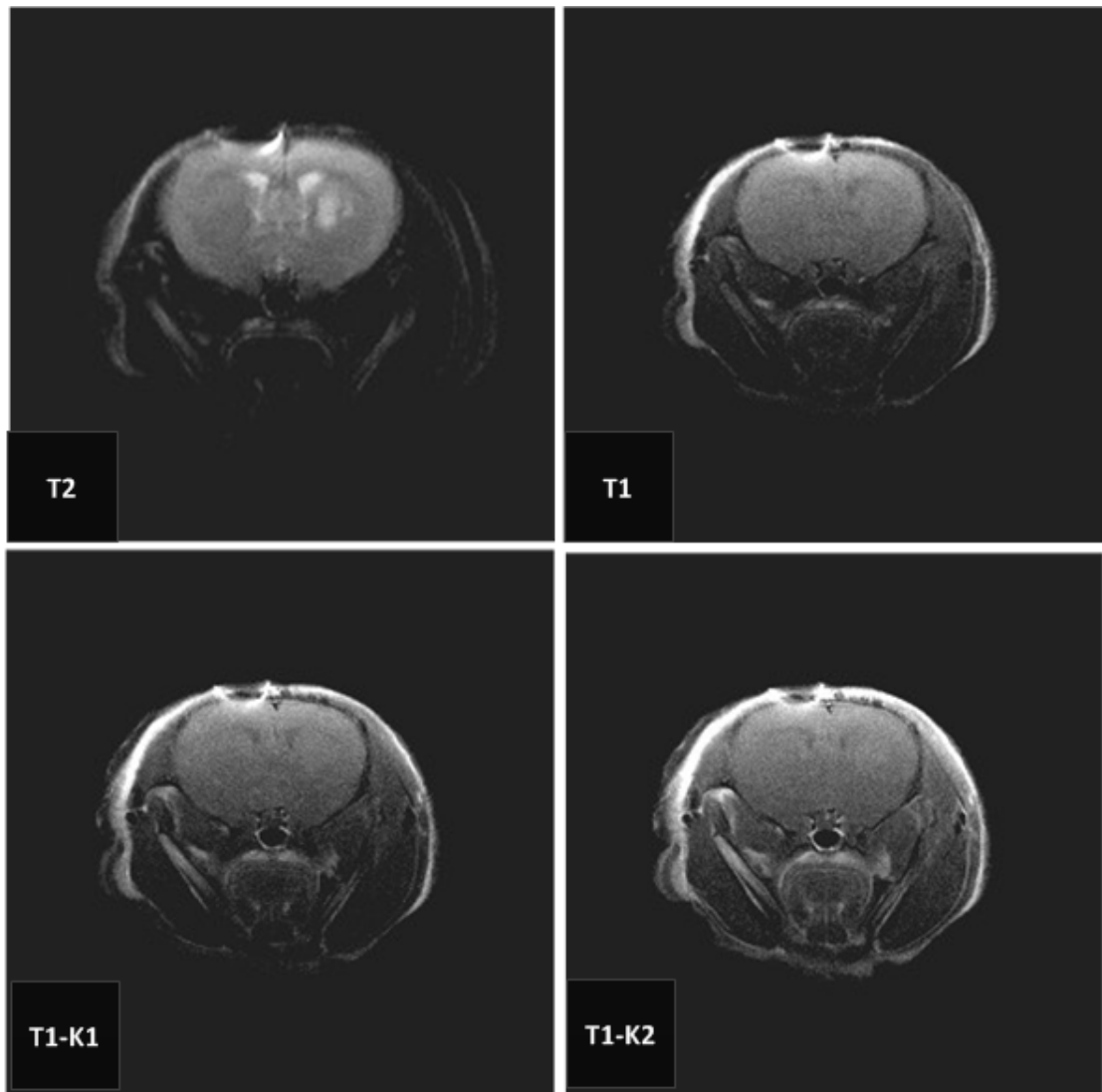


Abbildung 16: Beispiel einer Maus mit eindeutigem Tumor: deutlich hyperintenser Bereich an der Implantationsstelle mit T2 Wichtung, kaum sichtbar in T1 Wichtung und keiner deutlich Kontrastmittelanreicherung

Bei den Tieren im Hauptversuch wurde das bei den Vorversuchen etablierte intravenöse Verfahren der Kontrastmittelgabe angewendet. Weiter konnte durch angepasste Scanzeiten mit Kontrastmittel eine Anreicherung intra-tumoral und bei Tumor negativen Tieren, intravasal als Positivkontrolle erreicht werden.

4.3.2.2 Tumorzellen

Bei den mit TC implantierten Tieren wurde insgesamt bei 16 Mäusen ein MRT durchgeführt. Es wurde hiervon kein Tier als positiv eingestuft, eine Maus als verdächtig im Bereich des Kortex und 15 Tiere als negativ für Tumore. Die als verdächtig eingestufte Maus zeigte keinen Tumor bei der späteren Auswertung, zwei andere Tiere wurden als positiv mit kleinen Tumoren befundet.

Tabelle 27: Tumortake nach bildgebenden Verfahren bei den differenzierten Tumorzellen

Mäuse TC (RAV 39-d)	Zellzahl	MRT T2	MRT T1	MRT T1 mit Kontrastmittel
1	10.000	n.d.	n.d.	n.d.
2		-	-	-
3		n.d.	n.d.	n.d.
4		+/-	+/-	+/-
5		n.d.	n.d.	n.d.
6		n.d.	n.d.	n.d.
7		-	-	-
8		-	-	-
9		-	-	-
10		-	-	-
11	1.000	n.d.	n.d.	n.d.
12		n.d.	n.d.	n.d.
13		-	-	-
14		-	-	-
15		-	-	-
16		n.d.	n.d.	n.d.
17		n.d.	n.d.	n.d.
18		-	-	-
19		n.d.	n.d.	n.d.
20		-	-	-
21	100	-	-	-
22		n.d.	n.d.	n.d.
23		-	-	-
24		-	-	-
25		-	-	-
26		n.d.	n.d.	n.d.
27		n.d.	n.d.	n.d.
28		n.d.	n.d.	n.d.
29		n.d.	n.d.	n.d.
30		-	-	-

-: kein Verdacht, +/-: unklares Areal, +: verdächtiges Areal, ++: starker Tumor Verdacht, +++: hochgradiger Tumor Verdacht, n.d: nicht durchgeführt

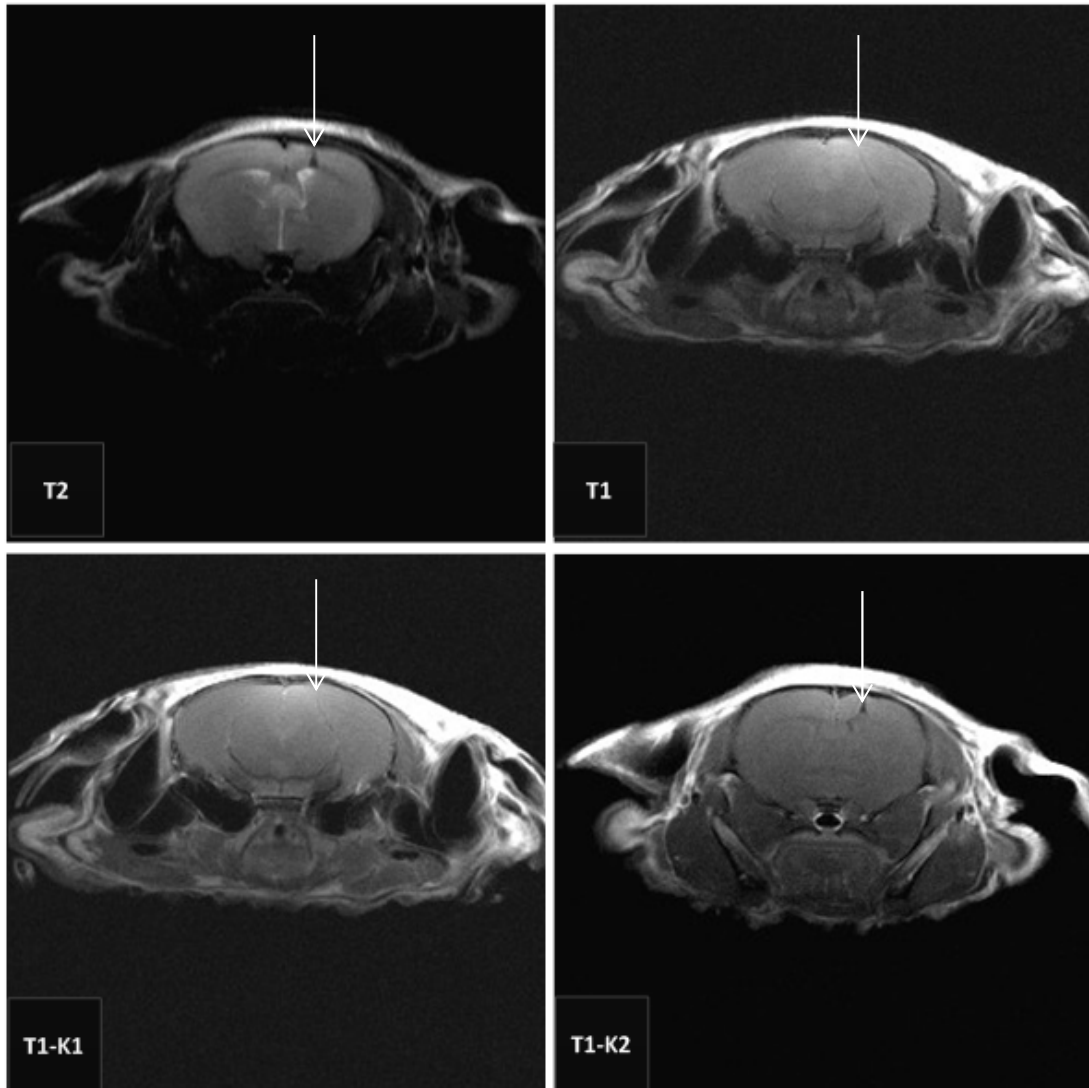


Abbildung 17: Beispiel einer Maus ohne sichtbare Veränderungen intrazerebral, sichtbarem Kontrastmittel intravasal und einem sichtbaren Einstichkanal von der Implantation

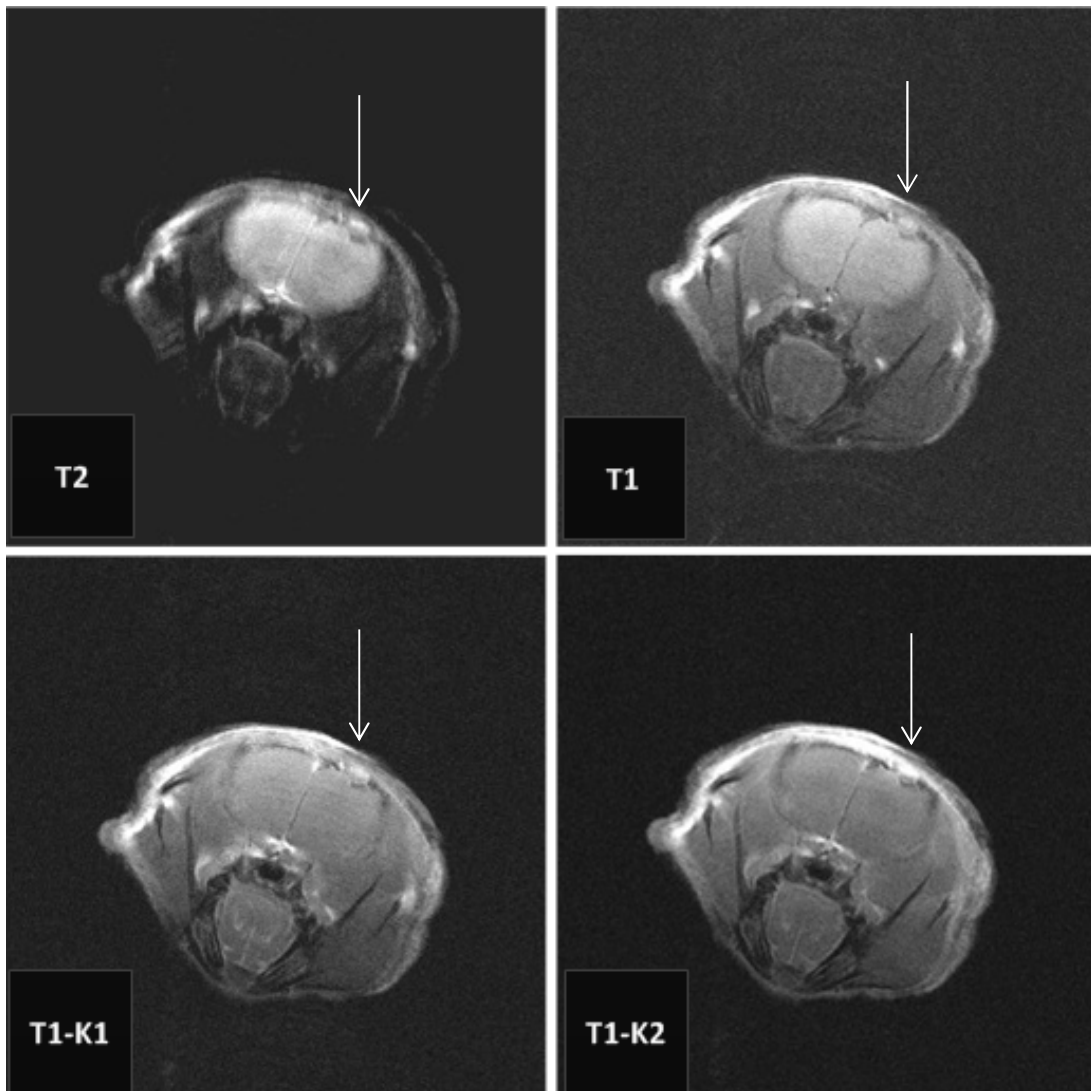


Abbildung 18: Beispiel einer Maus mit scheinbar soliden Veränderungen im Bereich des Kortex, sichtbarem Kontrastmittel intravasal

4.4 Histologie

Die Hirne wurden - wie oben beschrieben - mittels Mikrotom geschnitten und nach dem obigen HE Protokoll gefärbt. Ausgewertet wurden die Schnitte mikroskopisch anhand von Tumormerkmalen, wie erhöhter Mitoserate, Zelldichte, zentralen Nekrosen und atypischen Zellen.

Als positiv wurde jedes Tier mit Tumorzellen gewertet, unabhängig von der Tumorgroße.

4.4.1 Vorversuche

Von den insgesamt 25 Tieren konnte bei neun ein eindeutiger Tumor nachgewiesen werden. Dabei befand sich eine Maus mit einem GBM untypischen Zellbild. Bei den restlichen 16 Tieren zeigten sich keine auffälligen Regionen, die eine nähere Untersuchung (IHC) indiziert hätten.

Tabelle 28: Auswertung der HE Färbungen der Vorversuche

Mäuse Vorversuche	Zellen	HE Färbung positiv
BTM 19	RAV 20	+
BTM 20	RAV 20	-
BTM 21	RAV 20	+
BTM 22	RAV 20	+
BTM 23	RAV 20	+
BTM 24	RAV 20	+
BTM 25	Kontrolle	-
BTM 26	FB 6	-
BTM 27	FB 6	-
BTM 28	FB 6	-
BTM 29	RAV 21	-
BTM 30	RAV 21	-
BTM 31	RAV 21	-
BTM 32	Kontrolle	-
BTM 33	RAV 19	-
BTM 34	RAV 19	-
BTM 35	RAV 19	-
BTM 36	RAV 39	+
BTM 37	RAV 39	+
BTM 38	RAV 39	+
BTM 39	Kontrolle	-
BTM 40	RAV 17	-
BTM 41	Kontrolle	-
BTM 42	RAV 17	-
BTM 43	RAV 17	+
BTM 44	RAV 28	-
BTM 45	RAV 28	-
BTM 46	RAV 28	-
BTM 47	RAV 28	-

-: kein Tumor, +:Tumor

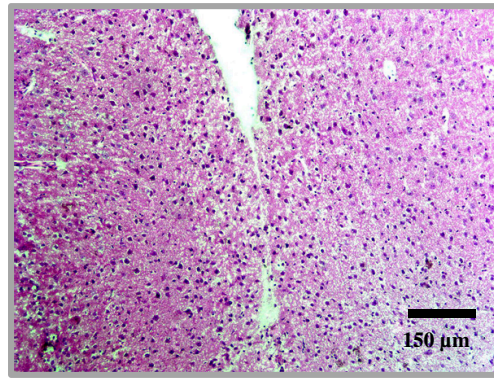


Abbildung 19: HE Färbung mit gut sichtbarer Implantationsstelle: keine auffällige Zellen

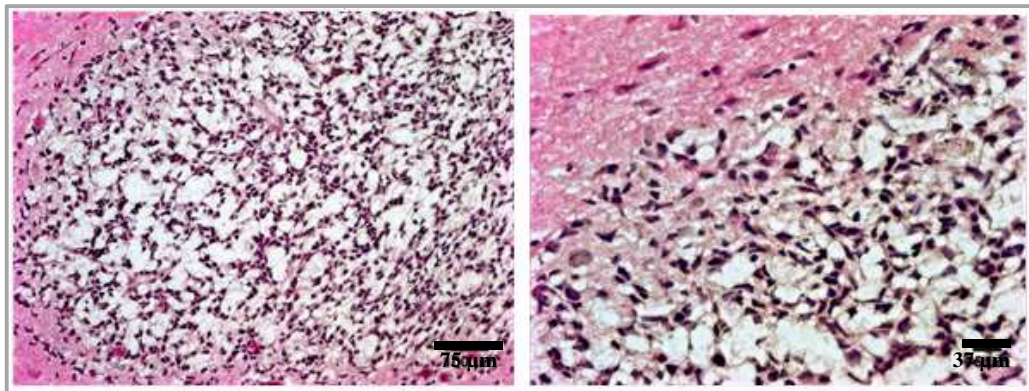


Abbildung 20: HE Färbung, RAV 39: deutliche nekrotische Areale, hoher Chromatin Gehalt (Mitoserate), gut sichtbar im Randbereich die fehlende Kapselbildung

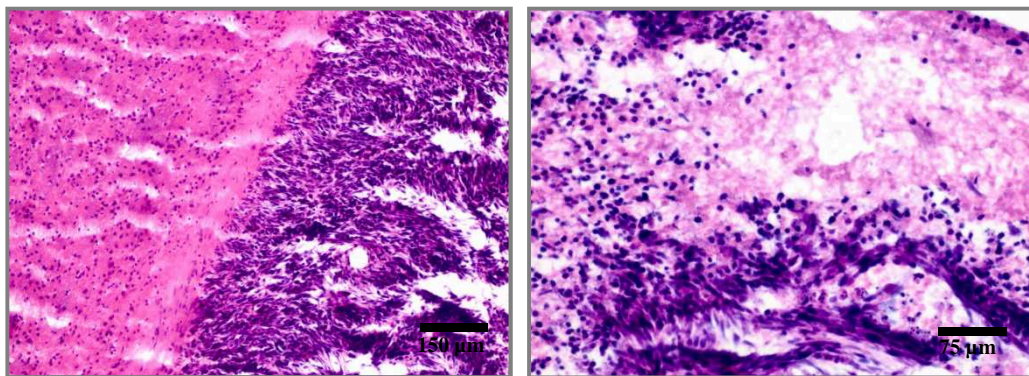


Abbildung 21: HE Färbung eines ausgeprägten Tumors post Implantation (RAV 20): atypische Tumor nach BTIC Implantation. Nach histopathologischer Einordnung: ungewöhnlicher, multilineärer Tumor

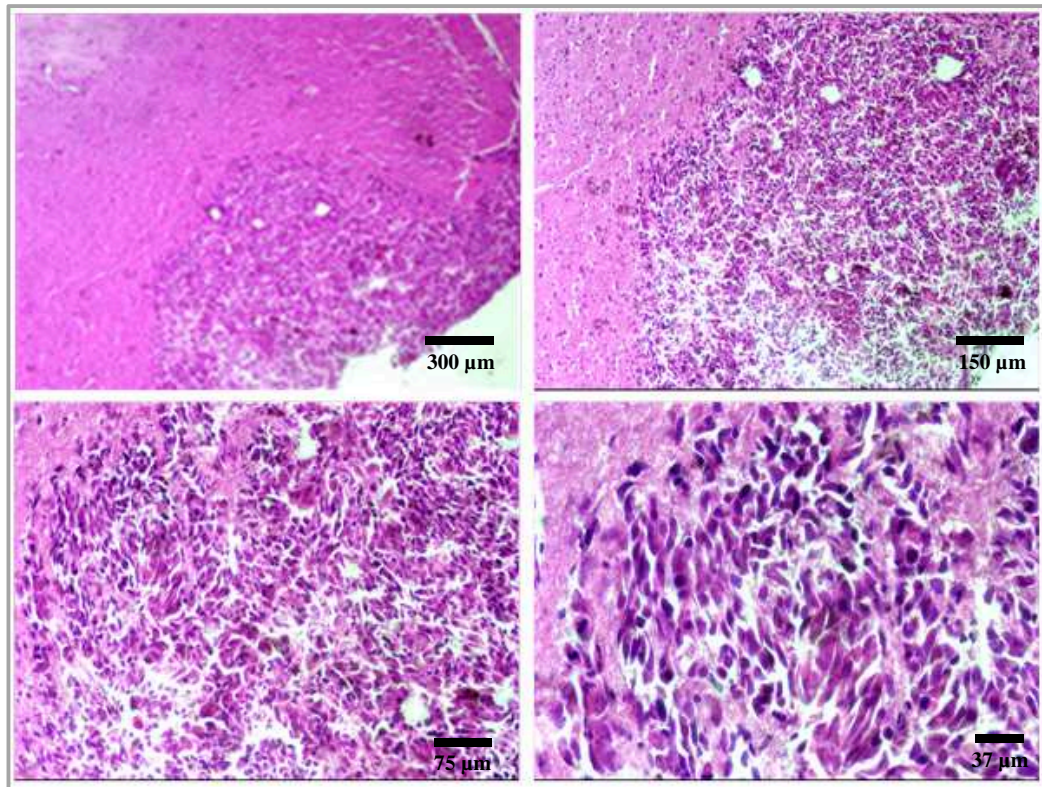


Abbildung 22: HE-Färbung mit deutlichen Tumorbefund (RAV 20): gut sichtbarer stark erhöhter Chromatin Gehalt (Mitoserate) mit kleinen nekrotischen Arealen, als Anzeichen für einen malignen Prozess, im Gegensatz zu RAV 39 mit teilweise mit spindelförmigen Arealen

4.4.2 Hirntumor initiierende Zellen

Bei den 25 Tieren mit implantierten BTIC, bei denen die Färbung durchgeführt wurde, konnte bei 13 Tieren ein Tumor nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich neben hochgradiger Mitoserate auch nekrotische Areale. Zusätzlich konnte bei zwei Tieren eine im Koronarschnitt sichtbare kreuzförmige Tumorverteilung entlang des Balkens und des Einstichkanals festgestellt werden. Bei den anderen fünf Tieren traten mehr zentrierte Tumore auf, bei denen sich jedoch auch einzelne Zellen außerhalb des Zentrums befanden. Bei sechs Tieren zeigten sich kleine Tumorzell-Gruppierungen, jedoch keine größeren Tumore. Die restlichen 12 Tiere wiesen keine Anzeichen auf eine Neoplasie auf.

Tabelle 29: Auswertung der HE Färbungen RAV 39, BTIC

Mäuse BTIC (RAV 39)	Zellzahl	HE Färbung positiv
1	1.000	+
2		-
3		+
4		-
5		+
6		+
7		+
8		n.d.
9		n.d.
10	Kontrolle	-
11	10.000	-
12		+
13		+
14		+
15		+
16		-
17		-
18		-
19		-
20	Kontrolle	-
21	100	+
22		+
23		-
24		-
25		n.d.
26	Kontrolle	-
27	100	-
28		-
29		+
30		+

-: kein Tumor, +:Tumor, n.d.: nicht durchgeführt

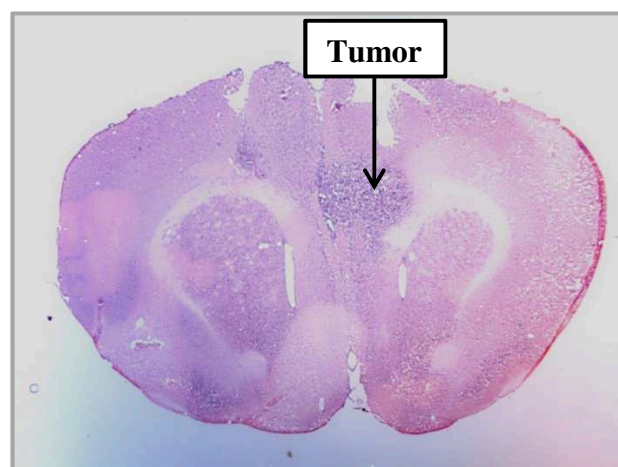


Abbildung 23: CSC 4, HE Übersicht, positiver Tumorbefund

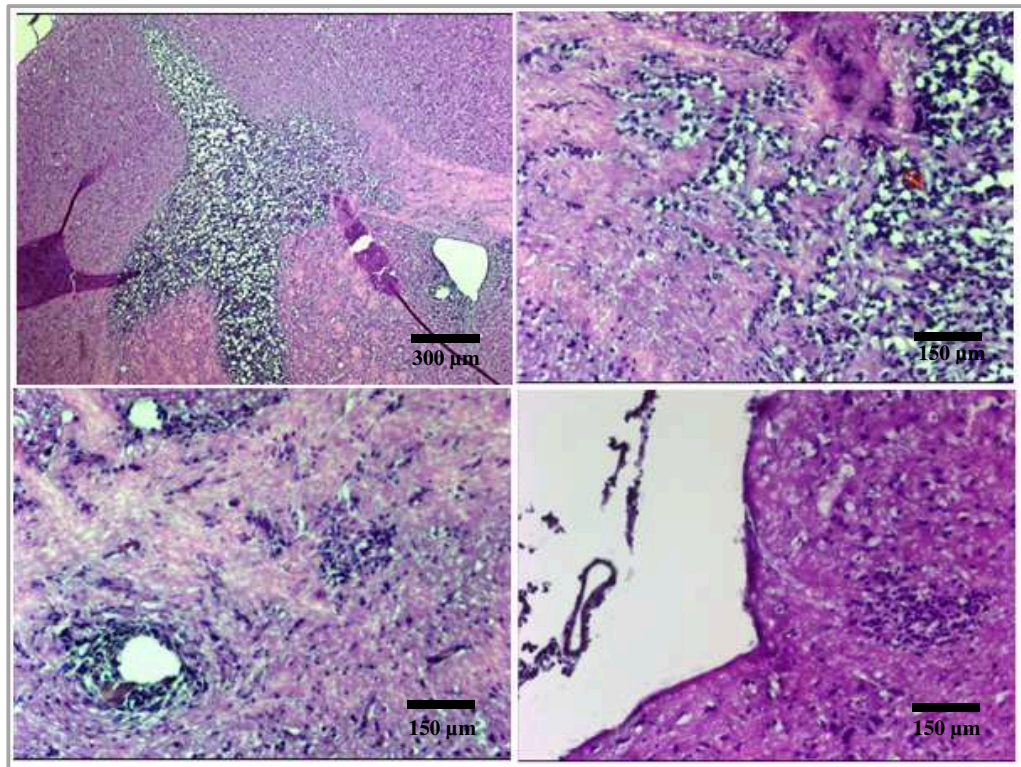


Abbildung 24: HE Färbung post Implantation von humanen BTICs: Färbung von einem GBM post Implantation (BTIC 14), gut sichtbar die Verteilung und Wanderung der Zellen entlang des Balkens, die hohe Mitoserate und atypischen Zellen mit teils perivaskulären Zellen

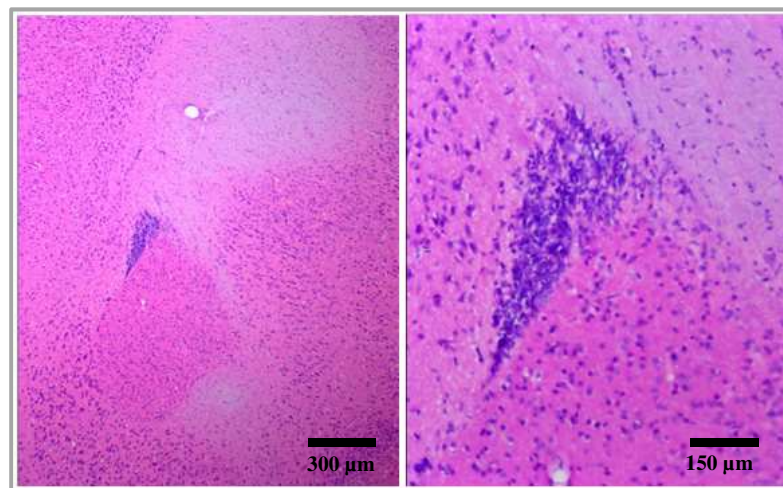


Abbildung 25: HE Färbungen von BTIC 1: positiver Befund direkt an der Implantationsstelle, deutlich kleinerer Tumor, als bei den anderen Tieren

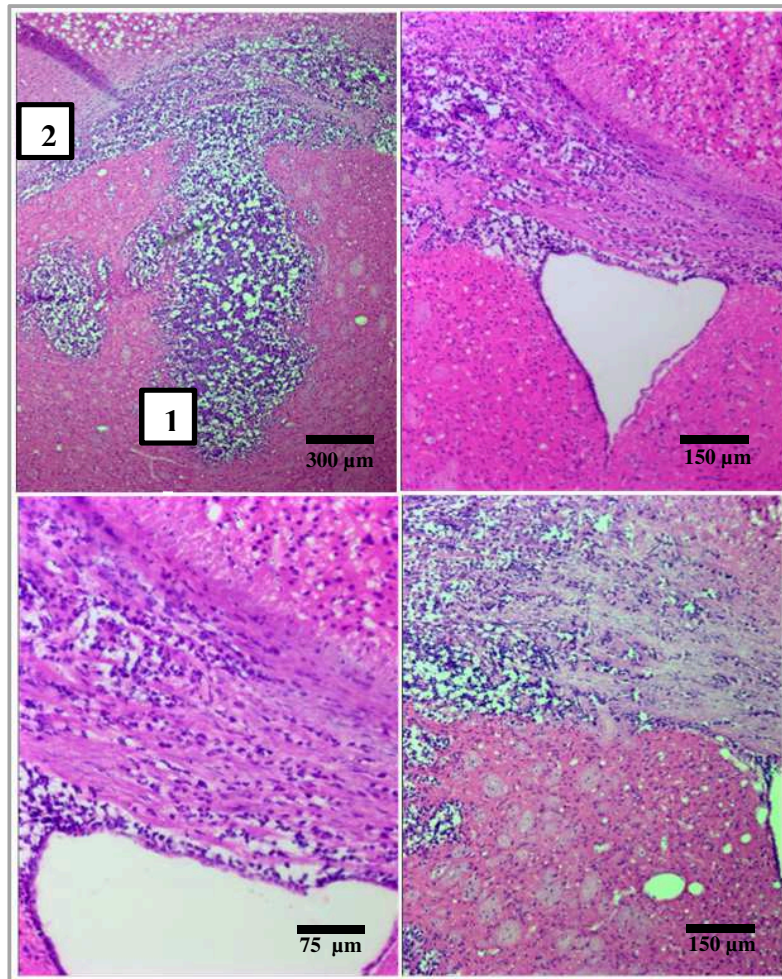


Abbildung 26: HE Färbung von einem GBM post Implantation von humanen BTIC (BTIC 3): gut sichtbar die Verteilung und Wanderung der Zellen entlang des Balkens, die hohe Mitoserate und atypischen Zellen

- | | |
|---|---|
| 1 | Injektionsstelle, senkrechter Einstichkanal |
| 2 | Migration entlang des Balkens |

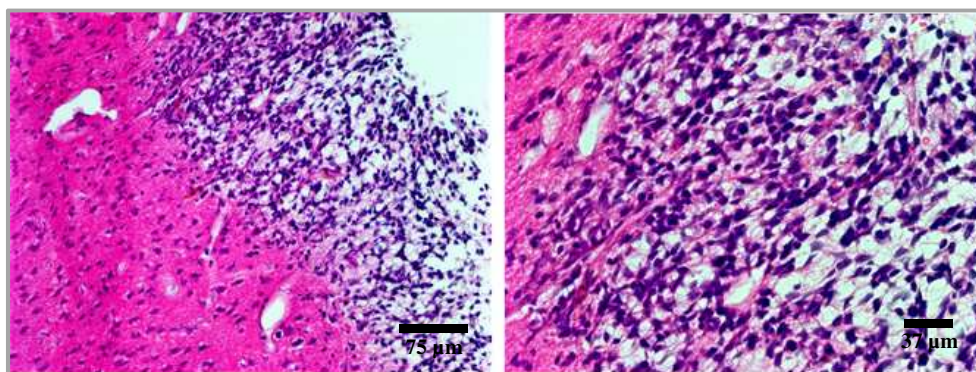


Abbildung 27: HE Färbung BTIC 12: solider Tumor im Bereich des Cortex an der Injektionsstelle

4.4.3 Tumorzellen

Bei den 23 mit TC implantierten Mäusen konnte bei zwei Tieren eine kleine Ansammlung von Tumorzellen festgestellt werden, diese Tiere werden als positiv geführt. Die restlichen Untersuchungen der 21 Proben ergaben keinen Befund.

Tabelle 30: Auswertung der HE Färbungen RAV 39-d, TC

Mäuse TC (RAV-d 39)	Zellzahl	HE Färbung positiv
1	10.000	-
2		+
3		-
4		-
5		n.d.
6		-
7		-
8		-
9		n.d.
10		-
11	1.000	-
12		-
13		-
14		-
15		-
16		+
17		-
18		-
19		n.d.
20		-
21	100	-
22		-
23		-
24		-
25		-
26		-
27		-
28		-
29		n.d.
30		-

-: kein Tumor, +:Tumor, n.d: nicht durchgeführt

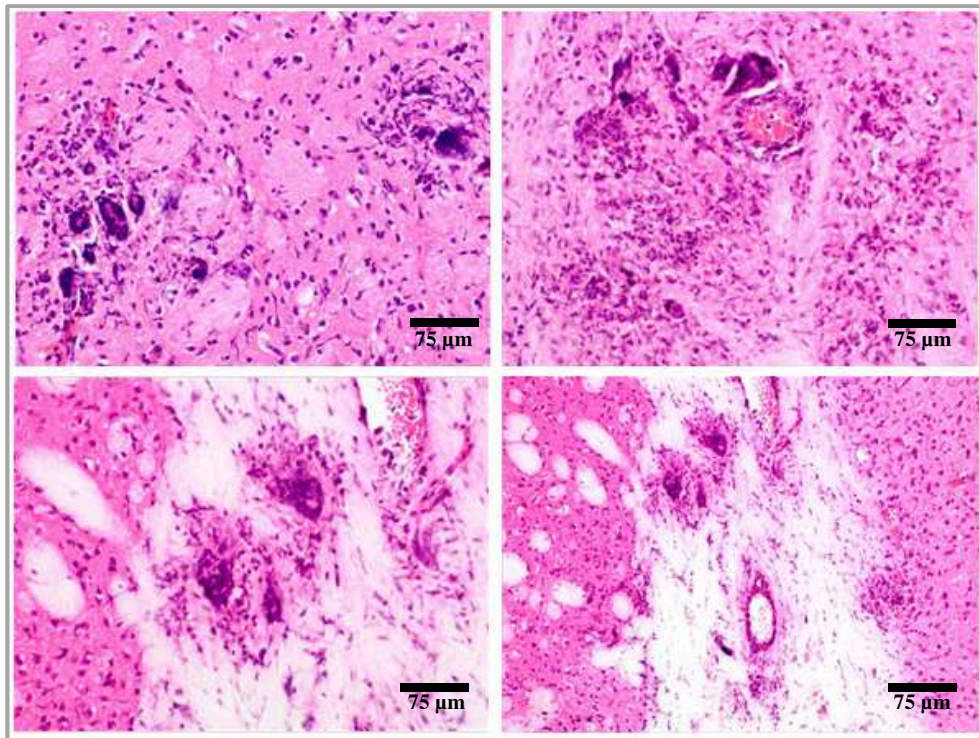


Abbildung 28: HE Färbung von einer Maus (TC 2) mit positiven Befund: gut sichtbar die wenigen, im Gegensatz zu den obigen Tumoren eher verstreut liegenden Zellen

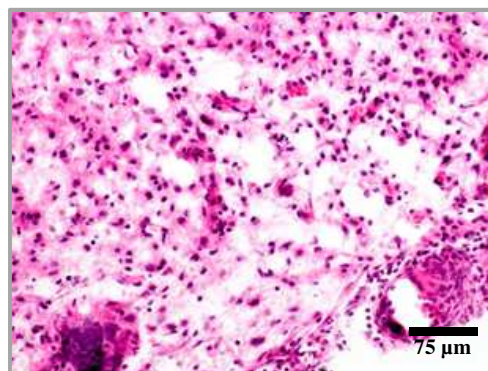


Abbildung 29: HE Färbung von einer Maus (TC 16) mit positiven Befund: auch hier gut sichtbare, einzelne Tumorzellen mit scheinbar geringerer mitotischer Aktivität, als die im ersten Teil implantierten Tumor initiiierenden (CSC) Zellen

4.5 Vergleich der Tumordetektion - Histologie und MRT

Um die zukünftigen Einsatzmöglichkeiten des MRT Verfahrens im Bereich der Hirntumorforschung im murinen Modell besser verifizieren zu können, fand ein direkter Vergleich der Tumordetektion in der Histologie und dem MRT statt. Insgesamt wurden zusammen in den Vor- und Hauptversuchen 59 Tiere sowohl histologisch, als auch bildgebend untersucht. Die positiven, als auch negativen Ergebnisse der Histologie, wurden dabei als Referenz mit 100% angenommen.

Insgesamt wurden histologisch 16 Tumore befundet, hiervon konnten im Vorhinein bildgebend sicher 11 Tumore erkannt werden. Bei zwei weiteren histologisch positiven Tieren wurde bei der Auswertung des MRT ein Verdacht erhoben, bei drei histologisch positiven Tieren waren im MRT keine Auffälligkeiten feststellbar.

Von den 43 Tieren, die histologisch als tumorfrei eingestuft wurden, konnten zuvor im MRT 39 richtig als unauffällig beurteilt werden. Die restlichen vier histologisch als negativ bewerteten Tiere wurden im MRT als verdächtig eingestuft.

Alle histologisch festgestellten Tumore, die vorher im MRT positiv befundet wurden, zeigten einen Tumordurchmesser von mindestens 2mm oder starke peritumorale Veränderungen.

Vergleicht man die histologisch positiven Befunde mit denen im MRT als richtig positiv erkannten Tieren, so konnte bei 68,75% der Tumor richtig detektiert werden. Insgesamt konnte von den histologisch negativen Tieren 90,7% als richtig negativ im MRT eingestuft werden.

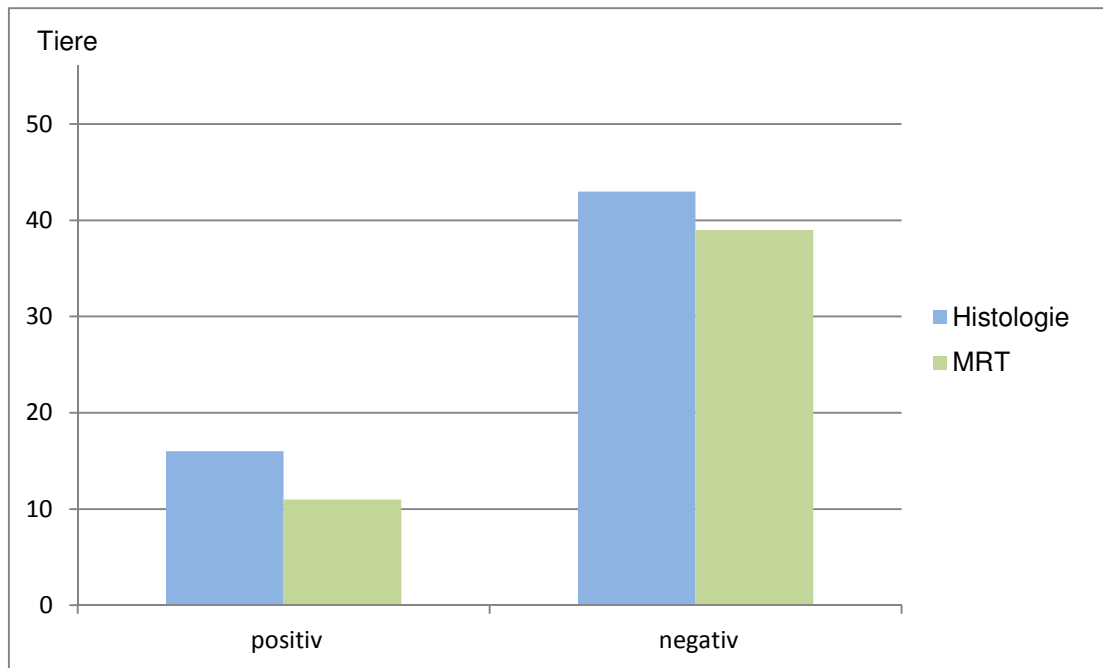


Abbildung 30: Vergleich der Tumordetektion im MRT in Bezug auf die positiv und negativ erkannten Tiere in der Histologie

4.6 Immunhistologie

Hierbei wurden verschiedenste immunhistologische Färbungen durchgeführt, um die generierten Tumore näher zu klassifizieren. Hierzu wurden die mit den TC implantierten Tiere mit positivem Tumorbefund zusätzlich zur Etablierung der ICH Verfahren verwendet. Der bei der HE- Färbung auffällige Tumor wurde gesondert untersucht.

In den Hauptversuchen wurden die Färbungen exemplarisch an einem Präparat mit repräsentativem Tumorwachstum (BTIC) durchgeführt. Alle anderen, bei denen vereinzelte Zellen unklarer Genese auffällig waren, wurden mit dem humanen Antikörper ANA gefärbt, um einen humanen Ursprung der Zellen sicherzustellen.

Alle, die nicht unter die oben bezeichneten Gruppen fielen, wurden mit „n.d.“ für nicht durchgeführt bezeichnet.

4.6.1 Vorversuche

Die untersuchten GBM Zelllinien zeigten überwiegend eine gute Expression von Nestin, SOX 2, CEBP- β , CD31 und STAT 3. Bei den drei mit ANA gefärbten Proben konnte eine eindeutig positive Detektion von humanen Zellen gezeigt werden.

Tabelle 31: Marker positive Tumore nach Färbung der Vorversuchs Präparate

Mäuse	Zellen	STAT 3	Nestin	SOX 2	CD 31	ANA
BTM 19	RAV 20	+	+/-	-	+	n.d.
BTM 21	RAV 20	-	-	+	+	n.d.
BTM 22	RAV 20	+/-	-	+	-	n.d.
BTM 23	RAV 20	+	+	+/-	+/-	+
BTM 24	RAV 20	+	+	-	+/-	n.d.
BTM 36	RAV 39	+/-	+	+	+	n.d.
BTM 37	RAV 39	+/-	+	+	+	+
BTM 38	RAV 39	-	+	-	-	+
BTM 40	RAV 17	+	+	+	+	n.d.
BTM 42	RAV 17	+	+	+	+	n.d.
BTM 43	RAV 17	-	+/-	+	+	n.d.
BTM 44	RAV 28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BTM 45	RAV 28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BTM 46	RAV 28	+	+	n.d.	+	n.d.
BTM 47	RAV 28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

-: negativ, +/-: schwach positive Areale, +: deutlich positiv, n.d.: nicht durchgeführt, da keine Tumor Induktion bei der Standardfärbung nachgewiesen werden konnte

4.6.1.1 Atypischer Tumor RAV 20

Bei den insgesamt vier implantierten BTICs Linien wurde bei sechs Tieren die Linie RAV 20 implantiert unter Verwendung von jeweils zwei unterschiedlichen Passagen bei jeweils drei Tieren. Die höhere Passage verursachte für das GBM untypische Tumore und zeigte hierbei ein histologisch außergewöhnliches Bild. Einer dieser Tumore wurde daher exemplarisch, außerhalb der normalen IHC Färbungen, untersucht.

Neben einer sehr hohen Proliferationsrate zeigte sich insbesondere das Bild eines undifferenzierten, neuralen Tumors mit teils gliosarkomartigen, teils mesenchymalen-myogenen Komponenten.

Tabelle 32: Untypischer Tumor

Maus/Zellen	Vimentin	Synapthophysin	S100	GFAP	Desmin	Mib1
BTM 20	+	+	+/-	+/-	+/-	++
RAV 20						

IHC Auswertung eines exemplarisch gefärbten Tumors nach Implantation einer späten Passage mit BTIC (RAV 20)

Die IHC Untersuchungen des Tumors sprechen für einen malignen, neuronalen Tumor mit gliosarkomartigen Komponenten und multilineärem Charakter. Die Bildung eines solchen Tumors aus einer etablierten BTIC Linie spricht zum einen für die Mutation der Zelllinie, zeigt aber zum anderen auch das grundsätzliche, multipotente Potential der BTIC.

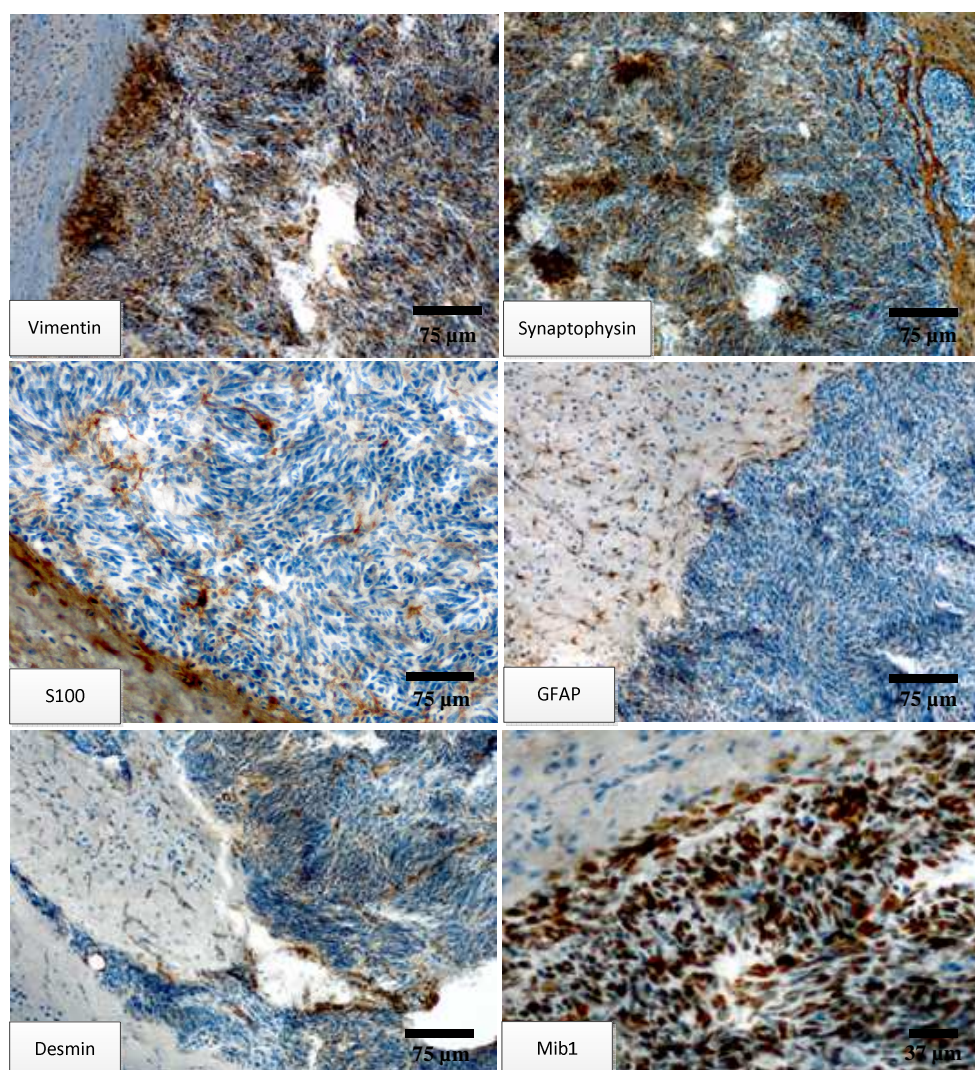


Abbildung 31: IHC des atypischen Tumors: RAV 20, BTM 20

4.6.2 Hirntumor initiiierende Zellen

Der hier verwendete exemplarisch BTIC Tumor wurde histologisch eindeutig als GBM beurteilt und zeigte bei den durchgeführten IHC Färbungen eine deutliche Expression von Stammzellmarkern, einer neuronalen Differenzierung und hoher Expressionen des Proliferationsmarkers Mib1.

Tabelle 33: Zusammenfassung der exemplarischen immunologischen Färbungen der TC und BTIC

Mäuse	SOX 2	Nestin	GFAP	Mib1	ANA
BTIC 3	++	++	+	+++	++
RAV 39					

Der immunologische, humane Marker ANA wurde bei neun mit BTIC implantierten Mäusen gefärbt, hiervon waren drei negativ und sechs als positiv zu werten. Bei den drei negativ befundeten Tieren waren nur vereinzelt auffällige Zellen in der HE Färbung sichtbar, wobei es sich jedoch nach dieser Färbung nicht um humane Zellen handelte. Diese Tiere wurden daher insgesamt als tumorfrei geführt. Bei den TC wurde lediglich ein Tier aufgrund des unklaren Befundes gefärbt und als positiv beurteilt, dieses Tier ist allgemein als tumorpositiv aufgeführt.

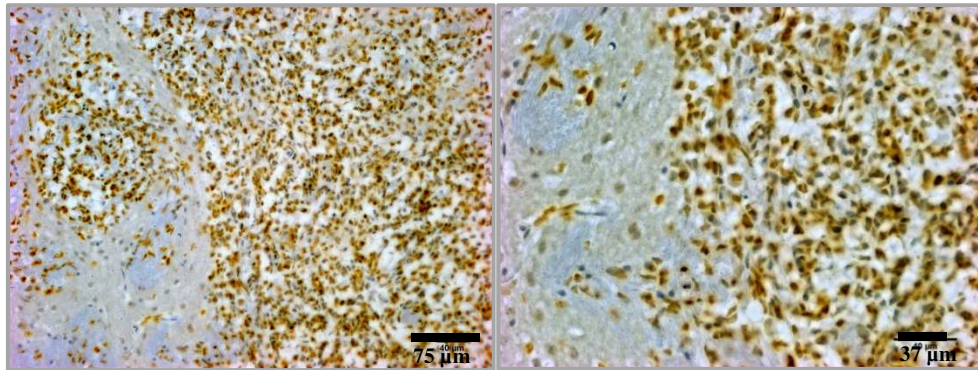


Abbildung 33: RAV 39, positive SOX 2 Färbung

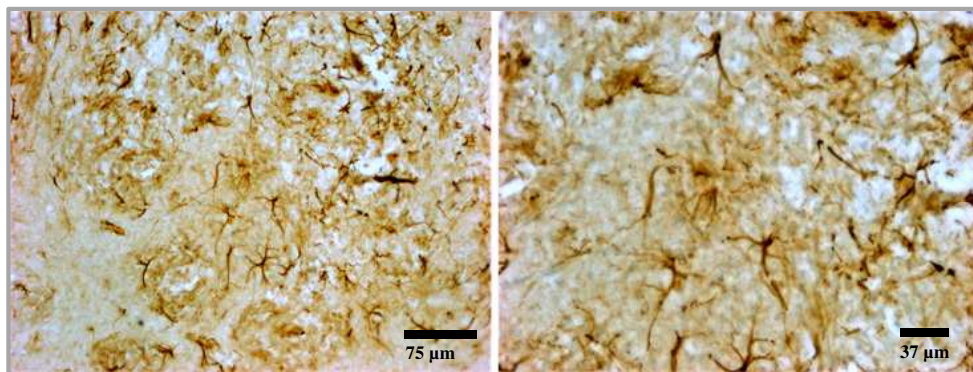


Abbildung 32: RAV 39, positive GFAP Färbung

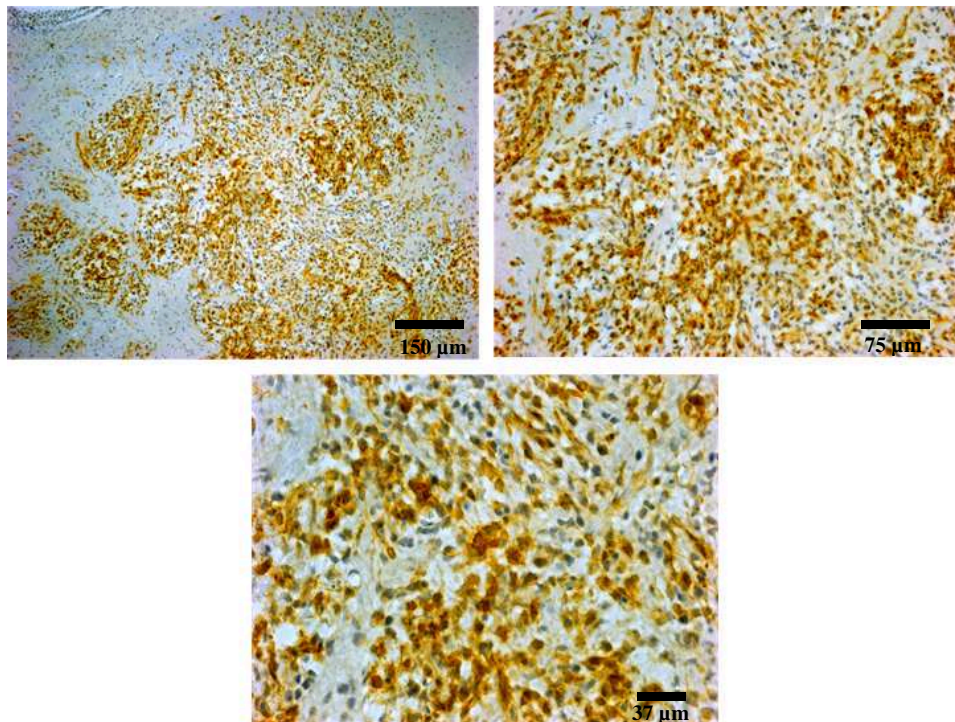


Abbildung 33: RAV 39, positiver Nestin Färbung

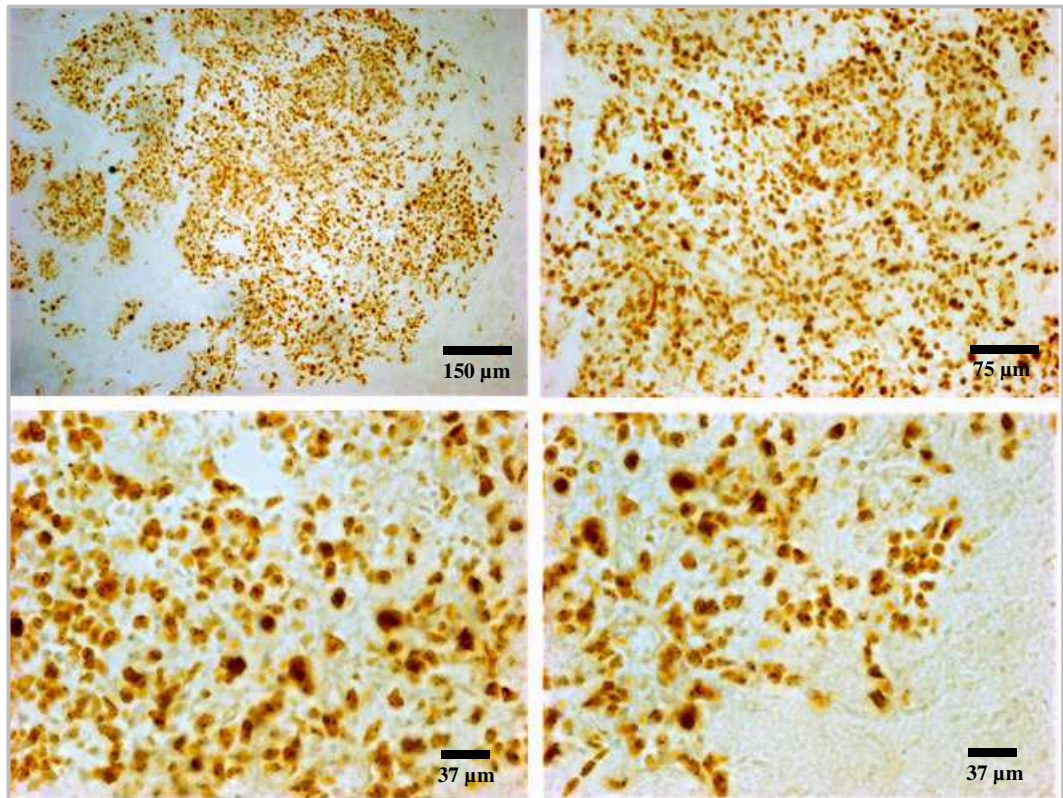


Abbildung 34: RAV 39, hochgradig, positive Mib1 Färbung mit gut sichtbaren tumorösen Zellen die entlang des Balkens migrieren

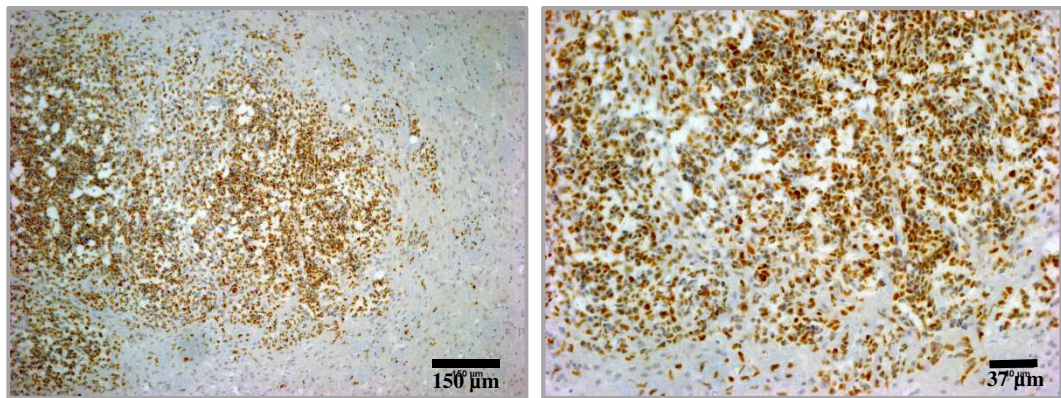


Abbildung 35: RAV 39, deutliche Detektion von ANA intratumoral

5 Diskussion

5.1 Versuchsaufbau und Tumorinduktion

Die Vorversuche dienten vornehmlich dem Ziel, die benötigten Methoden weiter zu etablieren, eine Sicherheit in den angewandten Verfahren zu entwickeln und eine Zelllinie des Instituts auszuwählen.

Insbesondere der *in vivo* Teil von der orthotopen Implantation der Zellen, bis hin zur kardialen Perfusion der Tiere, setzte für gute reproduzierbare Ergebnisse eine einwandfreie Methodik und sicheres Handling bei den Eingriffen voraus. Hierbei wurde, vor allem im Bereich der drei in Sedation stattfindenden Versuchsteile Implantation, MRT und kardiale Perfusion, an der Verbesserung bestehender Techniken und Narkosen, inklusive dessen Monitoring gearbeitet. Zudem wurde zusätzlich noch das bildgebende Verfahren bei der Maus für das 3 Tesla MRT, Siemens etabliert.

Im Rahmen der Hauptversuche sollte in dieser Arbeit durch die zwei unterschiedlich kultivierten Zellen und die drei unterschiedlichen Zellzahlen die These unterstrichen werden, dass eine kleine Gruppe undifferenzierter Zellen mit stammzellartigen Eigenschaften den Tumor unterhält. In der einen Gruppe wurden daher die differenzierten Zellen (TC) implantiert und sollten unabhängig von ihrer Zellzahl keine bzw. lediglich eine geringe Zahl an Tumoren generieren. Die Gruppe der undifferenzierten Zellen (BTIC) hingegen sollte eine Tumorinduktion von 80-100% zeigen. Beide Annahmen leiten sich von einer Publikation von Singh ab, in der die Tumorgenität auch bei deutlich geringerer Zellzahl bei BTIC noch bei 80% lag, wohingegen die TC nahezu keine Tumore generierten (Singh, 2004). Mit unseren Ergebnissen mit einer Tumorinduktion von 52% bei den BTIC und 8,6% bei den TC können wir zwar unterstreichen, dass die BTIC eine deutlich höhere Tumorgenität als die TC aufweisen, liegen jedoch in allen drei Gruppen unter einer 80% Tumorinduktion. Das könnte beispielsweise an der implantierten Zellpassage, der Vorbereitung der Zellen oder der Zeitspanne zwischen Zellernte und Implantation liegen. Weil aber in den Vorversuchen mit ähnlicher Passage und gleicher Methodik eine 100% Induktion bei der verwendeten Zelllinie erfolgte, kann ein Fehler in der Methodik aus-

geschlossen werden. Ein wichtiger Faktor für die Vitalität der Zellen stellt die Zeit zwischen Kultur und Implantation dar. Um möglichst verlustfrei zu bleiben, wurden nach der Hälfte der Zeit neue Zellen der gleichen Linie und Passage geerntet.

Trotz geringerer Tumorinduktion konnte nachgewiesen werden, dass bei allen drei Gruppen der BTIC eine gleich hohe Tumorinduktion stattfand, unabhängig von der implantierten Zellzahl (100, 1.000, 10.000). Das heißt, auch bei sehr geringer Anzahl von nur 100 implantierten BTIC zeigte sich eine deutliche Kapazität zur Proliferation. Zusätzlich konnte auch unterstrichen werden, dass die zwei durch TC Implantation induzierten Tumore eine deutlich geringere Größe als der überwiegende Teil der BTIC Gruppe aufwiesen. Dieses Ergebnis unterstreicht die These, dass BTIC die Haupttumormasse generieren, deutlich. Es konnte zusätzlich noch gezeigt werden, dass die Zelldichte und die Mitoserate der TC im Vergleich zu den BTIC in den generierten Tumoren deutlich geringer war. Keiner der TC Tumore zeigte Anzeichen einer Migration in das umliegende Gewebe, wohingegen bei den BTIC einzelne Zellen deutlich entlang des Balkens migrieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorinduktion bei den TC deutlich unter 20% liegt und somit signifikant niedriger ist als bei den BTIC. Dass TC ebenfalls eine geringe Tumorgenität aufweisen, ist bekannt, liegt hierbei aber in der Literatur bei 0-20% (Singh, 2004). Dieser Umstand lässt die These unterstreichen, dass die TC nur eine geringe Proliferationskapazität besitzen und keine deutliche Tendenz zur Migration zeigen.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kapazität der stammzellartigen, hirntumorinitiierenden Zellen zur Proliferation und Migration einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Tumorinduktion und das *in vivo* Verhalten zu den differenzierten Tumorzellen aufweist.

5.1.1 Zellauswahl der Vorversuche

Alle Zelllinien des Instituts Regensburg wurden aus frischem Gewebe kultiviert, das nach den Richtlinien der WHO als primäres GBM klassifiziert wurde. Es wurden insgesamt sechs Zelllinien in je 3-4 Mäuse (sechs bei RAV 20) verwendet. Von den sechs verwendeten BTIC Zelllinien zeigten vier Zelllinien ein positives Tumorwachstum. Drei dieser vier Linien wurden mit einem Tumortake von 100% und eine Linie mit 33% (eine Maus) beurteilt. Bei den restlichen zwei Zelllinien wurden, wie bei der mit NPC implantierten Kontrollgruppe, keine Tumore induziert.

Eine mögliche Erklärung für die unerwartet niedrige Tumorinduktion mancher BTIC Linien könnte sein, dass die Malignität der einzelnen Zelllinien unterschiedlich war. Dies wurde auch von Qiang et al beobachtet. Dort wurde beschrieben, dass unterschiedliche BTIC Linien eine unterschiedliche Tumorigenität aufweisen (Qiang, 2009). Zusätzlich kann in Betracht gezogen werden, dass sich während der unterschiedlich langen Kultivierung einzelner Zelllinien die Zellen in ihrem *in vivo* Verhalten verändert haben. Die Problematik bei der Kultivierung von Zellen ist hierbei zumindest bei adhärenenten Linien bekannt (DSMZ). Eine Möglichkeit der genaueren Klassifizierung der Zelllinien bietet beispielsweise eine vergleichende Genotypisierung der kultivierten Zellen und Gewebes des Ursprungtumors. Bei der Implantation der Vorversuche wurde eine orthotop Implantation von je 10.000 Zellen gewählt mit einem Endpunkt nach 12 Wochen. In einschlägiger Literatur wird von einer histologisch gut nachweisbaren Tumorinduktion von BTIC bei orthotoper Implantation von 10.000 Zellen von 100% nach 12 Wochen ausgegangen (Beier, 2007) (Singh, 2004) (Galli, 2004). Andererseits gibt es Untersuchungen mit einer höher implantierten Tumorzellzahl (100.000 Zellen), bei denen ein Endpunkt ab der vierten Woche eine Tumorinduktion zeigte. Bei der ersten, zweiten und dritten Woche konnten nur einzelne Tumorzellen, jedoch keine Tumormasse dargestellt werden (Sampetrean, 2011). Vereinzelt findet man auch Angaben von Endpunkten nach 16 Wochen. In den Vorversuchen wurde im Hinblick auf den Hauptversuch mit geringer Zellzahl und Versuchen von Singh und Beier für eine Haltung der Tiere über 12 Wochen

entschieden um sicherzustellen, dass die generierten Tumore sowohl histologisch, als auch im MRT nachgewiesen werden konnten.

In Hinblick auf die Ergebnisse ist die Haltungszeit jedoch bei der verwendeten Zelllinie als kritisch zu betrachten. Gerade in Bezug auf die MRT Untersuchungen wäre eine längere Haltung der Tiere sinnvoll gewesen, um einen größeren Tumordurchmesser zu erzielen.

5.1.2 Zellauswahl und Endpunkte der Hauptversuche

Die Auswahl der geeigneten Zelllinie fand auf Basis von Informationen der pathologischen Untersuchungen der postoperativ untersuchten Gewebeproben, der Vorversuche, des Wachstums und des Verhaltens in Kultur sowie des Genexpressionsmusters statt (Beier, 2007). Auf Basis dieser Untersuchungen wurde die Zelllinie RAV 39 gewählt, diese zeichnet sich durch ein stabiles Wachstum in Neurosphären, sowohl bei den TC, als auch den BTIC aus. Weiter zeigte sich eine CD133+ Markerexpression sowie eine kräftig positive GFAP, SOX2 und Nestin Färbung. CD133 ist ein Glykoprotein mit noch unbekannter physiologischer Funktion (Piechaczek, 2001). Es wird seit der Publikation von Singh et al. (Singh, 2003) als einer der Parameter zur Zelltypisierung beim GBM verwendet. Positive Zellen zeigen im Gegensatz zu CD133 negativen *in vitro* Stammzeleigenschaften und generieren *in vivo* auch nach serieller Implantation GBM (Beier, 2007) (Singh, 2004).

Die in den Vorversuchen ebenfalls mit 100% Tumorinduktion verwendeten RAV 20 generierten teils für das GBM untypische Tumore. Auf Basis der langen Kulturdauer dieser Zelllinie und der bekannten Problematik langer Kultivierung von Zellen wurde diese Zelllinie ausgeschlossen.

5.1.3 Biometrische Planung

Um zu gewährleisten, dass relevante Ergebnisse generiert werden können, wurde zur Planung der benötigten Versuchstierzahl der so genannte Fisher Exact Test mit dem statistischen Programm G*Power durchgeführt.

Hierbei trifft man aufgrund der Literatur die Annahme, dass die Tumorgenität von den BTIC auch noch bei sehr geringer Zellzahl (100) vorhanden ist und bei TC Implantation unter 20% liegt (Singh, 2004), (siehe 9.1). Nach den Berechnungen wurde eine Versuchstierzahl pro Gruppe von acht Tieren angegeben. Die Gruppengröße wurde mittels Reservetier auf neun Tiere vergrößert. Dies ermöglichte die Haltung einer kompletten Gruppe plus Kontrollmaus in einem Käfig, sodass ein besserer Vergleich unter den Einzeltieren stattfinden konnte und eine maximale Reduktion von unterschiedlichen externen Umweltfaktoren durch Käfigverteilung. So erhielten wir insgesamt sechs Käfige mit jeweils unterschiedlichen Zellzahlen. Durch Verluste von einigen Tieren, die als nicht auswertbar eingeordnet werden mussten, reduzierte sich die auswertbare Tierzahl bei einer Gruppe auf nur sieben Tiere.

5.1.4 Abbruchkriterien

Um den Gesundheitsstatus der Tiere während der gesamten Versuchsdauer zu monitoren, wurde während der Versuchsplanung ein Punktesystem erstellt, anhand dessen man die Tiere beurteilen konnte. Dabei wurden Parameter gewählt, die eine schnelle, aber auch sichere Einteilung der Tiere erlaubte. Die Planung zur Überwachung des Gesundheitsstatus stellt eine Voraussetzung für die Genehmigung eines Tierversuches dar. Das Punktesystem schließt eine zu hohe Belastung des Einzeltiers und der gesamten Gruppe aus. Es konnten alle Punkte bei den Kontrollen ohne größeren Aufwand und Stress für die Tiere eruiert werden. Ausnahme hierbei bildet die Beurteilung der Futter- und Wasseraufnahme, die sich pro Einzeltier als nicht beurteilbar erwies. Durch Kontrolle von Gewicht, Verhalten, Abwehr und Schmerzreaktion, Atmung, Motorik und Körperhaltung konnte aber eine ausreichende Einschätzung stattfinden. Zusätzlich wird durch eine fehlende Wasser- und Futteraufnahme auch eine starke Gewichtsreduktion induziert, sodass dieser Punkt indirekt bei dem Score erhalten bleibt. Bei künftigen Versuchen kann daher auf diesen Punkt verzichtet werden.

Die Versuchsdauer wurde auf 12 Wochen festgesetzt, da in einschlägiger Literatur gezeigt wurde, dass neben der gut nachweisbaren Tumorgroße ein überwiegender Teil der Tiere bis zu diesem Zeitpunkt noch keine stärkeren neurologischen Defizite aufwiesen (Singh, 2003). Die 12 Wochen waren nach dem Gesundheitsstatus der Tiere gut vertretbar. Die generierten Tumore zeigten jedoch teilweise geringe Durchmesser, da diese jedoch nicht als eine der Zielgrößen benötigt wurden, hatte dieser Umstand keinen Einfluss auf die vorliegende Auswertung. Eine kürzere Versuchsdauer wurde in der Literatur von vielen beschrieben. Bei Yamada et al konnte beispielsweise ein Tumorwachstum ab dem sechsten Tag nach Implantation mit der etablierten, hoch proliferativen GBM Zelllinie U87 nachgewiesen werden (Yamada, 2004). Bei Beier et al wurde ein Endpunkt von 50 Tagen mit der Implantation von 10.000.000 Zellen gewählt, um zwei verschiedene Versuchsgruppen zu vergleichen (Beier, 2007). Ein anderes Modell der Versuchsplanung stellt die wöchentliche Beendigung von Einzeltieren dar (Sampetean, 2011). Hierbei sollte die Veränderung des Tumors während des Wachstums gezeigt werden. Die Versuchsdauer muss je nach Zielgrößen, Versuchsaufbau und verwendeter Zelllinie und -zahl angepasst werden. Von einer kürzeren Versuchsdauer wurde abgesehen, um auch bei niedriger Zellzahl einen gut auswertbaren Tumor zu erhalten. Eine längere Versuchsdauer wurde nicht gewählt, weil eine zusätzliche Belastung der Tiere vermieden werden sollte. Auf Basis der teilweise doch sehr kleinen Tumore und des guten Habitus der Mäuse nach 12 Wochen hätte hier aber eine längere Versuchsdauer gewählt werden können.

5.1.5 Injektionsvolumen

In den ersten Vorversuchen wurde, wie in einigen Veröffentlichungen beschrieben (Singh, 2004), eine Zellzahl von 10.000 Zellen pro 10µl verwendet, später wurde das Volumen auf 5µl bei gleicher Zellzahl reduziert. Da in den Vorversuchen festgestellt wurde, dass auch bei niedrigeren Volumen die Zellsuspension stabil war, wurde das Volumen in den Hauptversuchen noch weiter reduziert. In der Literatur finden sich Angaben bis zu einem Injektionsvolumen von 100.000 Zellen pro 1 µl, die mit einer Injek-

tionsrate von 0,05µl/min (Yamada, 2004) ohne Probleme verwendet wurden. In anderen Publikationen wird ein Volumen von 2µl mit 100.000 Zellen implantiert (Sampetrean, 2011). Alle Tiere erhielten hier ein intrakraniell implantiertes Volumen von 2µl PBS mit einer Injektionsrate von 0,25µl/min mit oder ohne Zellen, da dies in mehreren Publikationen (Beier, 2007) (Beier, 2008) als Standard angegeben wird. Die Injektionsrate bei Implantation ist neben dem Volumen ebenfalls ein bedeutender Parameter, bei zu schneller Injektion und zu schnellem Repositionieren der Nadel kommt es häufig zu einem Reflux der Zellen entlang des Injektionskanals. Dies führt zur Bildung von atypischen Tumorformationen. Wählt man ein zu hohes Injektionsvolumen, kann dies zur seitlichen Verteilung von Tumorzellen in den Ventrikel führen (Yamada, 2004). Mit dem hier gewählten Verfahren mit 2µl Injektionsvolumen, einer Injektionsrate von 0,25µl pro Minute und einer Repositionierung der Nadel über 5 Minuten kann man davon ausgehen, dass die wenigen Tumore, die sich mehr im Bereich des Cortex befinden, wahrscheinlich durch eine zu schnelle Repositionierung der Nadel zustande kamen und nicht durch die Injektionsrate (Yamada, 2004).

Durch eine Resuspension der Lösung vor jeder Implantation und einzelner Aufnahme in die Hamilton Spritze konnte sichergestellt werden, dass die Zellsuspension stabil war. Es wird jedoch in der Literatur beschrieben, dass sich größere Spheres bilden können und die Nadel verlegen, dieser Fehler kann hier jedoch ausgeschlossen werden (Yamada, 2004). Die Injektion fand unter Sicht auf das Spritzenvolumen statt.

5.1.6 Mausmodell

In den Vorversuchen wurden für die Implantation die in der Arbeitsgruppe Pädiatrie etablierten NOD/?SCID Mäuse ausgewählt. Diese weißen, behaarten, immundefizienten Tiere zeigten sich als gutes Modell für die Implantation. Jedoch traten bei der Vorbereitung des Eingriffes oft Schwierigkeiten bei der Rasur der Implantationsstelle zwischen der Ohrbasis auf. Eine vollständige Rasur ohne leichte Hautirritationen war kaum möglich. Außerdem stellte die gründliche Rasur einen zusätzlichen Arbeits-

schritt dar. Im Rahmen der Hauptversuche wurden daher die NMRI nu/nu Mäuse verwendet.

Diese NMRI Mäuse stellen in der Literatur ein ebenfalls sicher etabliertes xenographes Modell dar. Daher ist davon auszugehen, dass sich beide Modelle für die GBM Implantation eignen und ein Wechsel zwischen den Mausmodellen keinen Einfluss auf die zu erwartende Tumorinduktion hat (Uchida, 2000; Gangemi, 2009; Beier, 2007; Yamada, 2004).

In den Hauptversuchen wurden aufgrund der vorhandenen Erfahrung der Arbeitsgruppe Neuroonkologie, einschlägiger Literatur (Beier, 2007) und des leichteren Bezugs der NMRI nu/nu Tiere über die Uniklinik, sich für diese gut handelbare Linie entschieden. Diese sind schon seit 1966 ein in der Wissenschaft genutztes Modell und wurden bei Pantelouris erstmals genauer aufgrund Ihrer Thymusaplasie verifiziert und mit fötalen und neugeborenen Mäusen verglichen (Pantelouris, 1970). Nacktmäuse sind als nicht immunkompetente Tumormodelle, speziell für orthotop injizierte humane Zellen etabliert (Beier, 2007). Die Injektion von Hirntumor initierenden Zellen generiert in den verwendeten NMRI nu/nu Mäusen histologisch und biologisch dem humanen Ursprungstumor sehr ähnliche Tumore und wurde daher hier als etabliertes Modell verwendet.

Durch das vollständige Fehlen der Körperbehaarung stellte sich im Versuch allerdings die Problematik dar, während der Sedation die Körpertemperatur stabil zu halten. Die sieben Tiere, die intraoperativ verstarben, zeigten zunächst stabile Vitalparameter, wurden jedoch nicht wach und zeigten Anzeichen einer Unterkühlung. Um die Belastung zu reduzieren und den Kreislauf zu stabilisieren, wurde daher während der folgenden Narkose, einschl. Aufwachphase, mit Wärmequellen (Wärmelampe, Heizplatte, Wärmehandschuh) gearbeitet. Zusätzlich wurde unterstützend 37°C warmes NaCl 0,9% als subkutane Infusion und ein O₂ Inhalationssystem verwendet. Aufgrund dieser Maßnahmen konnten die Verluste am Ende auf 0% reduziert werden.

Ein weiteres Problem stellte die Tierhaltung dar. Alle zur Verfügung stehenden Tumormodelle zur Xenotransplantation stellen nicht immunkompetente

Modelle dar. Die Tiere sind daher sehr anfällig für Pathogene. Die gewählte Tierhaltung stellte ein offenes System dar, war jedoch mit einem internen Inkubator speziell für immundefiziente Tiere ausgestattet. Im selben Raum befanden sich außerhalb des Inkubators weitere, hauseigene nude Mäuse sowie im Inkubator noch nude Mäuse einer anderen Arbeitsgruppe, jedoch aus der gleichen Zucht. Innerhalb der ersten fünf Versuchswochen verstarben bei den BTIC Gruppen vier Tiere perakut und weitere wurden aufgrund von Apathie und Gewichtsverlust nach den obigen Abbruchkriterien beendet. Bei den TC Gruppen verstarben ebenfalls vier Tiere perakut und fünf wurden frühzeitig beendet. Hiervon konnten zwei Tiere bei den BTIC und alle vier Tiere bei den TC nicht ausgewertet werden. Es konnte kein Unterschied der perakut verstorbenen Tiere bei der Bewertung nach dem Punkte Score zu den jeweiligen Kontrolltieren festgestellt werden. Die verstorbenen Tiere wurden adspektorisch untersucht und zeigten hochgradige bis keine makroskopischen Befunde. Am häufigsten zeigte sich eine Hepatitis mit teilweise Aszites. Das Gehirn wurde präpariert, war jedoch wegen der schnellen Autolyse histologisch nicht mehr auswertbar.

Das gesamte Haltungssystem wird jährlich mittels Bestands-Sentinel untersucht. Die Untersuchung fand wenige Wochen vor dem Einsetzen der ersten Versuchsgruppe statt und war ohne Befund. Bei den Tieren, die trotz Erkrankung auswertbar waren, wurde nur bei einem Tier ein kleiner Tumor festgestellt. Es ist davon auszugehen, dass kein Zusammenhang zwischen Tumorinduktion und Erkrankung bestand. Eine eindeutige Diagnosestellung war durch die unspezifische Symptomatik anhand der Untersuchungen des Tierschutzbeauftragten, Dr. Thilo Spruss, nicht möglich. Die gewählte Haltung stellte sich als ungeeignet für ein Xenograft-Modell dar. Bei künftigen Versuchen sollte bei der Verwendung von Xenograft-Modellen die Haltung in einem geschlossenen System stattfinden.

5.1.7 Stereotaktische Implantation

Die orthotope Implantation wurde bei allen Tieren inklusive der Kontrolltiere durchgeführt. Es wurde sich, wie in einschlägiger Literatur beschrieben, für die Implantation in die kraniale, rechte Hemisphäre, das Putamen, ent-

schieden (Yamada, 2004) (Sumeer Lai, 2000) (Nishikawa, 1994). Die Strukturen der kranialen Hemisphäre sind optimal geeignet, da es dort erst bei fortgeschrittenen Volumenbildungen zu neurologischen Ausfällen kommt. Eine Implantation, die nicht orthotop ins Parenchym erfolgt, sondern beispielsweise in den Ventrikel, den subarachnoidalen Raum oder sogar subkutan, beeinflusst durch die Mikroumgebung das Tumorwachstum und ist damit ungeeignet (Yamada, 2004).

Zur optimal reproduzierbaren Implantation wurde ein Stereotaxie Rahmen für Mäuse verwendet. Die Anwendung des Rahmens bei orthotopen Implantationen in Mäuse wurde in vielen Veröffentlichungen gezeigt. Dabei wird immer die Injektion in der Region des Putamen beschrieben, jedoch unterschiedliche Angaben zu den Zielkoordinaten angegeben. So beschreibt Nishikawa beispielsweise eine Stelle ab den Bregma mit AP + 1mm, ML + 1,8mm, DV - 2,5 bis 3mm (Nishikawa, 1994). Lai et al verwenden AP + 1mm, ML - 2,5mm, DV - 2,5 (Sumeer Lai, 2000), Kelly et al AP + 1mm, ML - 2,0mm, DV - 2,0mm (Kelly, 2009) und Cheng implantiert ohne Stereotakt in die rechte kraniale Region (Cheng, 1996). Auf Basis der Literatur wurde die Implantation mit den Koordinaten mit AP + 0,5mm, ML - 1,5 mm und DV - 2,5mm entschieden. Die generierten Tumore der gesamten Versuchsreihen zeigten überwiegend eine sehr gute Lage, es konnte jedoch die Abweichung des senkrechten Einstichkanals beobachtet werden. Der hierbei gebildete Tumor zeigt eine nach lateral verschobene Lage mit gutem rundlichen Wachstum. Ursache hierfür stellt die schräge Lagerung im Stereotaxie Rahmen dar. Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellt, wie oben beschrieben, das Injektionsvolumen bzw. die Injektionsrate dar (siehe 5.1.5). Insgesamt kann jedoch festgehalten werden, dass das verwendete Verfahren ein sicheres Implantieren im Putamen ermöglicht, selbst wenn teilweise leichte Abweichungen in der Achse zu beobachten waren.

5.1.8 MRT

Bei der Durchführung des MRT stellte sich vor allem die Schwierigkeit dar, das vorhandene etablierte Verfahren für Ratten auf die Maus zu übertragen. Das vorhandene 3 Tesla MRT von Siemens mit dem hoch frequentem Radiosystem (RF) ist gekoppelt mit einem Volumen Resonanz System (RAPID Biomedical, Rimpär, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 69mm und einem nutzbaren Inhalationssystem für Ratten (Pillai, 2011). Die Mäuse mit einem durchschnittlichen Schädel von 20mm wären bei einfacher Lagerung zu weit von der Spule entfernt, um noch scharfe Bilder zu erzeugen. Daher wurde ein Schaumstoffkissen, inklusive wärmendem Handschuh unter die Maus gelegt. Nachteil dieser Vorgehensweise war eine durch die zusätzliche Unterlage bedingte teilweise leichte Schräglagerung des Kopfes. Für Routinemessungen bei Mäusen würde ein festes, in die Spule integriertes System verhelfen, künftig die Lagerung besser zu standardisieren. Das Inhalationssystem für die Narkose konnte mithilfe einer 2 ml Spritze als Maske gut angepasst werden.

Durch die lange Narkosedauer stellte der Erhalt der Körpertemperatur der Nacktmäuse ein weiteres Problem dar, was aber durch die integrierte Heizspule mithilfe eines wassergefüllten Handschuhs als Wärmeleiter gelöst werden konnte. Die Temperatur wurde dabei auf 37,5°C eingestellt.

Ein weiteres Verfahren, welches verfeinert wurde, war die Anwendung von Kontrastmitteln. Wie in der Literatur überwiegend angegeben wurde Gadolinium (Gd-DTPA) verwendet (Aime, 2009) (Pillai, 2011) (Gambarota, 2011). Gadolinium zeigt eine gute Anreicherung im Tumorgewebe. Nur wenige Gliome weisen keinen positiven Befund auf, aufgrund von intakten intratumoralen Gefäßen (Gambarota, 2011). Die Dosis Gadolinium wurde von Pillai et al mit 0,2mmol/kg KGW (Pillai, 2011) übernommen. In der Literatur finden sich hierzu verschiedene Angaben, je nach Indikation verwendet man bei Mäusen 0,1mmol/kg KGW bis 0,3mmol/kg KGW. Die Injektion kann hierbei sowohl i.p. (intra peritoneal), als auch intravenös erfolgen (Aime, 2009). Der Vorteil der i.p. Injektion liegt in dem einfachen Handling und der dadurch verbesserten Anwendungssicherheit. Als Nachteil kann die längere Wartezeit und schlechtere Verteilung, die höhere

Gesamtdosis und das erneut nötige Bewegen des Tieres zwischen den Sequenzen gesehen werden. Eine direkt intravasale Injektion kann intrakardial (i.c.) oder intravenös (i.v.) erfolgen. Die i.c. Injektion macht das Bewegen des Tieres zwischen den Sequenzen ebenfalls erforderlich und stellt zudem ein deutlich invasiveres Verfahren als die i.v. Injektion dar. Trotz des oftmals schwierigen Legens eines Venenverweilkatheters (28 G) fand diese Vorgehensweise Anwendung, weil man während aller Sequenzen das Tier nicht umlagern musste und damit alle neun Schnittbilder in den 4 Sequenzen einander entsprachen. Bei jedem Tier wurde der Sitz der Braunüle mittels NaCl überprüft. Es stellt sich jedoch die Frage, ob sich während der Narkoseinduktion bei Tieren mit positivem Tumorbefund und negativer Kontrastmittelanreicherung der Sitz verändert haben könnte. Alternativ kann es sich aber auch um GBM handeln, die keine erhöhte Permeabilität der Gefäße aufweisen. Einen weiteren Parameter hinsichtlich der Kontrastmittelanreicherung stellt die Scanzeit dar. Es konnte in den Vorversuchen kein positiver Befund trotz großen Tumordurchmessern erhoben werden. Dies könnte beispielsweise daran liegen, dass erst 25 Minuten nach Kontrastmittelinjektion gemessen wurde (Pillai, 2011). In der Literatur wird beschrieben, dass die Anflutung unmittelbar erfolgt und die intravasale Clearance bei Mäusen von Gadolinium bei 20 Minuten liegt. Danach findet man eine Anreicherung in Leber und Knochen sowie positivem Gewebe von über einer Woche. Der Hersteller, Firma Bayer, gibt im Beipackzettel für die Anwendung in der Humanmedizin eine Untersuchung unmittelbar nach Injektion an. Es ist also davon auszugehen, dass eine Positivkontrolle der Injektion intravasal bei den Tieren im Vorversuch nicht möglich war. Es bleibt unklar, ob die Problematik bei der Injektion, oder der Permeabilität der Gefäße lag. Es konnte nachfolgend in den sechs Hauptversuchsgruppen durch frühere Messung gezeigt werden, dass die Gabe des Kontrastmittels vollständig und sicher stattfand. Bei allen Tieren konnte eine Kontrolle der nach Kontrastmittelgabe positiven Gefäße erfolgen. Es wurde gezeigt, dass sich das Verfahren der intravenösen Kontrastmittelgabe über die laterale Schwanzvene hervorragend eignet.

Das MRT zur alleinigen Diagnostik einer intrakraniellen Umfangsvermehrung bei der Größe einer Maus stellte sich als nur bedingt geeignet dar. Die Sensitivität des MRTs im Vergleich zur Histologie zum Nachweis eines Tumors lag in dieser Arbeit bei 68,75%. Die Sensitivität zum Ausschluss eines Tumors bei 90,7%.

Insgesamt wurden 31,25% als falsch negativ im MRT beurteilt. Die relativ niedrige Sensitivität zum Nachweis positiver Tiere im MRT liegt größtenteils an der nachweisbaren Tumorgroße. Eine sichere Beurteilung konnte erst bei Tumoren erfolgen, deren Durchmesser über 2-3mm lagen oder bei denen peritumorale Veränderungen, wie Ödembildung, ausreichend vorhanden waren. Die Ergebnisse gehen einher mit Angaben aus der Literatur, in denen beschrieben wird, dass zunehmend mit der Tumorgroße die Sensitivität des MRTs steigt. Diese liegt ab 5-10mm bei 100% (Puls, 2010). Die Nachweisgrenze wird dabei mit 3-4mm angegeben, je nach peritumoralen Veränderungen und Qualität des MRT Gerätes.

Als verdächtig wurden 9,3% der negativen Tiere beurteilt. Alle diese Tiere wiesen an der Injektionsstelle operativ bedingte Veränderungen auf, diese waren im MRT nicht klar abgrenzbar zu tumorösen Veränderungen.

Der Einsatz des MRTs zur Überwachung des murinen Tumormodells stellt sich dennoch als vielversprechend dar. Gerade bei der orthotopen Implantation von Tumorzellen im Bereich des Putamen können auch größere Tumore ohne zu starke Belastung der Tiere induziert werden. Es kann hiermit beispielsweise eine *in vivo* Kontrolle des Tumorstwachstums unter Medikation erfolgen.

Um die Sensitivität beim murinen Tumor-Modell genauer zu klassifizieren, könnten Folgeversuche mit wöchentlichen MRT und nachfolgender histologischer Beurteilung, inklusive Bestimmung des Tumordurchmessers erfolgen.

5.1.9 Aufarbeitung des Gewebes

Bei den durchgeführten Versuchen wurde die Aufarbeitung des Gewebes mit der Kombination einer direkten Perfusionsfixation und anschließender Gefrierschnitte entschieden. Alternativ bestand die Möglichkeit von Gefrierschnitten ohne vorherige Fixation oder den Paraffinschnitten (Dietzmann, 2005) (Hopwood, 1984).

5.1.9.1 Kardiale Perfusion

Die kardiale Perfusion dient der PFA Fixation von histologischen Präparaten über einen Zentimeter Durchmesser und gilt als Goldstandard der Gewebsfixation (Kasukurthi, 2009).

Neben der vollständigen schnellen Sättigung im Gewebe wird durch das erstmalige Spülen mit NaCl 0,9% eine weitgehende Blutleere der Gefäße, inklusive Kapillare, erreicht und somit eine Reduktion von Artefakten in den Präparaten. Im Gegensatz hierzu steht die Immersionsfixation, hierbei findet eine passive Sättigung des Gewebes durch Einlegen in das jeweilige Medium statt.

In der Literatur wurden oft Vergleichsstudien zwischen Immersion- und Perfusionsfixation und verschiedenen Perfusionsmedien geführt. Es konnte beispielsweise von Beach gezeigt werden, dass das perfundierte Gewebe eine deutlich bessere Qualität mit homogenen Schnittbild in der ICH zeigte (Beach, 1987). Von Kamazawa wurde Glutaraledhyd mit PFA und deren Einfluss auf die Sensitivität der ICH verglichen. Als optimal zeigte sich die Verwendung von 2% PFA (Kanazawa, 1996). Kasukurthi verglich ebenfalls beide Medien und zusätzlich hierzu die Immersions- mit der Perfusionsfixation bei Gewebe bis 1cm Durchmesser. Auch hier konnte ein deutlich besseres Ergebnis bei der Verwendung von PFA festgestellt werden, jedoch keine schlechteren Schnitte durch die Immersionsfixation (Kasukurthi, 2009). Einen Nachteil der Perfusion stellt das aufwendige Verfahren dar, welches eine gut etablierte und sichere Technik voraussetzt (Dietzmann, 2005). Fehler, wie ein zu hoher intravasaler Druck, unvollständige Perfusion oder ausfallendes PFA, können zu schlechter Fixation und Beurteilbarkeit der Präparate führen.

Es wurde hier der Verwendung von PFA bei der kardialen Perfusion der Vorzug gegeben, weil alle Präparate einen Durchmesser von mehr als 1cm aufwiesen. Ein Schneiden der Gehirne kam in diesem Fall nicht in Frage, weil die Gefahr bestand, Randbereiche des Tumors verwerfen zu müssen. Bei einzelnen Tieren der Vorversuche konnten kleine Ansammlungen von Erythrozyten festgestellt werden - ein Anzeichen einer unvollständigen Perfusion. Als Ursache des Fehlers stellte sich meist ein schlechter Sitz der intrakardialen Nadel oder ein zu früher Herzstillstand mit schlechter Verteilung des PFA dar. In der Literatur findet man Angaben, bei denen bei Ratten die Nadel in die Aorta ascendens gelegt und die Spülung mit NaCl 0,9% heparinisiert wird (Lamberts, 1986). Vorteil hierbei ist das Arbeiten unter Sichtkontrolle. Mit Anwendung dieser Methodik wäre aufgrund des deutlich kleineren Lumens und der fragileren Gefäßwand der Aorta ascendens der Maus ein zu hohes Risiko der Ruptur des Gefäßes verbunden gewesen. Eine Ruptur würde die gesamte Perfusion des Gewebes verhindern.

Die unvollständige Perfusion bei den Einzeltieren war in situ gut durch den fehlenden Muskeltonus der Tiere erkennbar und konnte teilweise während des Eingriffes noch korrigiert werden. Das Problem konnte durch eine routiniertere Durchführung und eine Anpassung des Zeitmanagements im weiteren Verlauf beseitigt werden.

In den Hauptversuchen konnte die kardiale Perfusion sicher durchgeführt werden und zeigte bei allen Präparaten eine gute Fixation des Gewebes. Zusätzlich wurde nach der Perfusion zur Kälteprotektion noch eine anschließende Dehydrierung mittels Sucrose durchgeführt. Diese Maßnahme verhindert die Bildung von Kristallen im Gewebe beim Einfrieren. Die Kombination beider Verfahren findet in der Literatur häufig Anwendung, weil die Qualität der Präparate dank ihrer deutlich besser erhalten bleibt. Sie kann jedoch zu einer Reduktion der Fixationsstärke führen (Dietzmann, 2005).

Alternative Methoden zur Gewebsfixation stellt die Paraffineinbettung dar. Mit dieser Methodik erreicht man eine weitaus höhere Stabilisation des Gewebes und damit die Möglichkeit, dünnste Schnitte (unter 7µm) anzufertigen. Diese Schnitte erlauben im Ergebnis eine leichtere histologische

Auswertung von einzelnen Zellen ohne Überlagerungen, als dies bei dickeren Schnitten der Fall ist. Im Gegensatz hierzu sind, wie bei dickeren Gefrierschnitten, größere Strukturen - wie Astrozyten und Dendriten - besser darstellbar. Ein Nachteil nach Paraffineinbettung ist auch die deutlich aufwendigere Durchführung der ICH. Dabei maskiert das Paraffin manche AG-Strukturen mit teilweise sogar irreversibler Schädigung dieser Strukturen und verschlechtert damit die Sensitivität in der ICH deutlich (Dietzmann, 2005). Manche AK, wie das für uns relevante SOX2, sind selbst nach Entparaffinisierung negativ.

Aufgrund dessen wurde in dieser Versuchsreihe die Verwendung von fixierten Gefrierschnitten gewählt. Der Nachteil der etwas dickeren Schnitte hatte in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Auswertung. Bei weiteren Versuchen kann überlegt werden, ob innerhalb einer Gruppe beide Techniken kombiniert werden oder auf SOX2 verzichtet und ganz auf Paraffinschnitte umgestellt werden kann.

5.1.9.2 Färbungen

Die Hirne der insgesamt 77 Tiere aus den Vor- und Hauptversuchen wurden nach der Anfertigung von Gefrierschnitten gefärbt und histologisch beurteilt. Die Auswertung fand nach der Standard Färbung mit Hämalaun-Eosin statt. Anhand der Ergebnisse wurden repräsentative Proben ausgewählt und mit ICH Markern gefärbt. Die Auswahl der Marker erfolgte auf Basis von Angaben aus einschlägiger Literatur und wurde mit dem Schwerpunkt zum Nachweis der Stammzelligkeit der Zellen angepasst.

5.1.9.3 Immunhistologie

Das Glioblastom multiforme ist ein schwach differenzierter Tumor, der ein sehr variables histologisches Bild aufgrund seiner hohen Differenzierungskapazität zeigen kann (Louis, 2007). Die Heterogenität des GBM stellt dabei für die histologische Diagnostik und Auswahl der ICH Panels eine Herausforderung dar.

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf den Nachweis der Stammzellartigkeit und der Proliferations- und Migrationsfähigkeit der Tumore gelegt. Ziel war es, die Hypothese zu unterstreichen, nach der eine kleine Gruppe von stammzellartigen Zellen den Tumor unterhält. Hierzu wurden verschiedenste Immunhistologische Färbungen an Tumoren der Vorversuche und an einem exemplarischen Tumor des Hauptversuchs durchgeführt. Es wurden hierbei klassische Stammzellmarker, wie beispielsweise SOX2 gewählt, um die Stammzellartigkeit der Tumore zu unterstreichen. Zusätzlich wurden weitere Marker zur genaueren Differenzierung sowie zur Einstufung der Proliferations- und Migrationsfähigkeit verwendet, wie beispielsweise Nestin und STAT3. Um sicherzustellen, dass alle Tumore humanen Ursprungs waren, wurde vor allem in Fällen von kleineren Tumoren der humane Antikörper ANA verwendet. Über das gewählte Antikörper Panel wurde eine Beurteilung des Tumortyps ermöglicht. Weiter konnte bei den Tumoren des Hauptversuchs bestätigt werden, dass sie dem Ursprungstumor entsprachen.

In der Literatur wird häufig die STAT3 Expression beim GBM herangezogen. Es ist bekannt, dass STAT3 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Proliferation, Genexpression und Apoptose von BTIC beim GBM spielt und bei hochmalignen Tumorformen deutlich stärker exprimiert wird (Brantley, 2008). STAT3 wird hierbei oft zur Aussage über die Prognose herangezogen, weil bei GBM mit besonders hohem STAT3 Niveau oftmals eine schnellere Regression stattfindet (Doucette, 2012) (Rahaman, 2002). Doucette beschreibt zusätzlich, dass CD 31 parallel zur signifikant höheren STAT3 Expression mit der Malignität steigt (Doucette, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die STAT3 Expression bei den Tumoren der Vorversuche untersucht. Es konnte bei allen eine starke Expression beobachtet werden, die mit der ebenfalls untersuchten CD 31 Expression korrelierte.

CD 31 ist ein endothelialer Marker, der im ZNS vor allem vaskulär vorkommt und bei Tumoren verwendet wird, um dessen Differenzierung einzugrenzen. Zusätzlich wird CD 31 als Marker für die Vaskularisation eines Tumors verwendet als Kennzeichen von hoch malignen Tumoren. Die

Expression peritumoral war in allen gefärbten Fällen sichtbar und unterstreicht die starke Vaskularisation und Malignität des GBM.

Bei den Vor- und Hauptversuchen wurde als einer der neuronalen Stammzellmarker beim Glioblastom SOX2 verwendet (Ellis, 2004). Es konnte bei zwei von drei Tieren mit implantierten RAV 39 eine gute Expression gezeigt werden. Im Hauptversuch zeigte sich bei dem exemplarischen Tumor eine hohe Expression. SOX2 gilt neben der vorzugsweise verwendeten Funktion als Stammzellmarker auch als Zeichen der Malignität bei den verschiedenen Gliomformen (Berezovsky, 2014) (Annovazzi, 2011). Annovazzi vergleicht beispielsweise 133 verschiedene Gliome anhand ihrer Malignität und deren SOX2 Expression. Beides korrelierte bei den *in vitro* kultivierten Zellen und den Daten der ICH aus frischem Tumorgewebe. An Stellen hoher Proliferation konnte außerdem *in vivo* der höchste Gehalt an SOX2 festgestellt werden (Annovazzi, 2011). In der Literatur wird von Berezovsky über das Runterregulieren von SOX2 ebenfalls eine Korrelation zur der Malignität und der Nestin Expression festgestellt. Nestin zeigte eine vergleichbare Expressionsreduktion wie SOX2 nach Regulation. Zusätzlich wurde gezeigt, dass SOX2 in Kombination mit noch unbekannten Faktoren die Entwicklung von NPC zu pluripotenten Zellen reguliert und als Marker für BTIC im GBM geeignet ist (Berezovsky, 2014). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die gute Expression von SOX2 die hohe Malignität des Tumors unterstreicht und die These der Stammzellartigkeit einer kleinen Population von Tumorzellen bestätigt.

Einen weiteren Marker, der verwendet wurde, stellt Nestin dar. Nestin gilt sowohl als Stammzellmarker, als auch als Proliferations- und Migrationsmarker (Mokry, 2004). Im gesunden adulten ZNS kann er vor allem in Bereich der stammzellreichen SVZ nachgewiesen werden. Beim GBM konnten von Veselska unter anderem ein erhöhtes Level von Nestin im Zellkern nachgewiesen werden (Veselska, 2006). Von Zhou wird eine Veränderung von Mobilität und Invasivität beim primären GBM beschrieben, die assoziiert ist mit der Nestin Expression (Zhou, 2000). Trotz vieler Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Stammzellartigkeit exprimieren-

der Zellen gilt Nestin nicht als klassischer Stammzellmarker (Schiffer, 2014). Schiffer verglich in Versuchen die GFAP mit der Nestin Expression im GBM in Bezug auf die perivaskuläre Stammzellnische. Es konnte gezeigt werden, dass in Bereichen mit massiver Mib1 Expression insbesondere Nestin bei unreifen Zellen exprimiert wird. GFAP hingegen wurde kaum detektiert. In hyperproliferativen Bereichen wurde massiv SOX2, Nestin und Mib1 exprimiert (Schiffer, 2014). Bezieht man die Angaben aus der Literatur auf die Ergebnisse der Versuche, bietet die hohe Expression von SOX2 und Nestin im Tumor und auch im Randbereich bei migrierenden Zellen einen deutlichen Hinweis auf die Stammzellartigkeit der Tumorzellen und die deutliche Tendenz zur Proliferation und Migration.

Im Gegensatz zu Nestin stellt GFAP einen etablierten Marker für Stammzellen der subventrikulären Zone, der sogenannten „radial glia“ Zellen dar (Malatesta, 2008) (Liu, 2006). Bei Koexpression mit weiteren Markern, wie Sox2 und Nestin, kann von einem vorläuferähnlichen Charakter der Zellen ausgegangen werden. Andererseits stellt die Expression von GFAP alleine einen Marker für astrozytäre Differenzierung dar.

Ein weiterer verwendeter Marker stellt Mib1 dar. Er gilt als Standard Proliferationsmarker in der Onkologie und korreliert in seiner Expression mit der Malignität eines Tumors (Moskowitz, 2006) (Weller, 2004). In allen gefärbten Schnitten zeigte sich eine kräftig positive Färbung. Mib1 eignet sich hervorragend zur Tumordetektion beim Glioblastom (Moskowitz, 2006). Parallel zur Mib1 wird die Verwendung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) beschrieben (Liu, 2014). Hierbei korreliert die Expression ebenfalls mit der Malignität der Tumore. EGFR wurde jedoch in der Literatur bisher nur als prognostischer Faktor beschrieben und nicht als isolierter Proliferationsmarker (Liu, 2014). Clark hingegen beschreibt, dass EGFR beim GBM nur in 50% der Fälle überexprimiert ist und sieht den Rezeptor als potentiellen Ansatzpunkt für eine neue Therapie (Clark, 2012). Im Gegensatz hierzu wird Mib1 von jeder Zelle in allen Zellzyklusphasen, außer G0 gebildet, und stellt daher einen weitaus zuverlässigeren Marker dar.

Als selektiver humaner AK wurde ANA verwendet, was eine sichere Detektion der humanen Zellen im Mausgewebe erlaubte. Dieser wird beispielsweise bei Marsden verwendet, um nach xenographen Transplantationen von humanen Brusttumorzellen in nude Mäusen die Zellen sicher zu detektieren (Marsden, 2012). Der AK wurde hier verwendet, um unklare Zellnester eindeutig als human oder murin zu identifizieren. Das Verfahren wurde vorher an humanen Tumoren etabliert.

Die oben beschriebenen Marker wurden bei den getesteten Proben in teils unterschiedlicher Intensität detektiert. Vor allem in den Vorversuchen, bei denen mit vier verschiedenen GBM Linien gearbeitet wurde, zeigt sich eine teils sehr unterschiedliche Expression einzelner Marker, was für die typische Heterogenität des GBM spricht. Beispielsweise zeigt RAV20 eine geringe bis keine Nestin, jedoch eine gute SOX2 Expression, was für eine stärkere neurale Differenzierung spricht, als bei den anderen Linien. Die weiter verwendete Linie RAV39 zeigte eine deutliche Expression von SOX2, Nestin, GFAP, Mib1 und ANA, was für einen neuronalen, hoch malignen, humanen Tumor spricht.

Insgesamt als kritisch muss allerdings die Färbung nur eines exemplarischen Tumors des Hauptversuchs gesehen werden. Sinnvoller wäre nicht nur ein Vergleich der Ergebnisse zu den Tumoren der Vorversuche gewesen, sondern auch der direkte Vergleich der Markerexpression unter den RAV-39 BTIC und TC Tumoren.

5.2 Korrelation der Ergebnisse zum Gesamtprojekt

Diese Dissertation ist Teil der Grundlagenforschung der Wilhelm-Sander-Therapieeinheit Neuroonkologie der Uniklinik am Zentrum für Hirntumoren in Regensburg. Diese Einrichtung widmet sich dabei, neben einer individuell angepassten Therapie für Patienten, der Erforschung und Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten auf dem Gebiet primärer Hirn- und Rückenmarkstumoren, Hirnmetastasen und dem paraneoplastischen Syndrom. Dabei liegt der Schwerpunkt insbesondere auf dem Gebiet der malignen Gliome.

Im Rahmen dessen wird versucht, die in der Grundlagenforschung gewonnenen Erkenntnisse zeitnah in klinische Studien umzusetzen. Um klinische Studien ermöglichen zu können, werden verschiedenste Ansätze für Therapien vorerst *in vitro* etabliert. Die Arbeitsgruppe Neuroonkologie Regensburg beschäftigt sich dabei vor allem mit dem Bereich des Tumormetabolismus und der Erforschung der tumorinitiierenden Zellen beim primären Glioblastom (GBM).

Im Bereich des Tumormetabolismus wurde beispielsweise die Gabe von Diclofenac untersucht. Es konnte mittels NMR-Spektroskopie und Mikrodialyse *in vivo* intratumoral eine Laktat-Akkumulationen gezeigt werden, die auch bei *in vitro* Versuchen mit BTIC nachweisbar waren. Durch Diclofenac wurde eine Hemmung der Laktatdehydrogenase mit einer Suppression von Migration und Proliferation der Zellen nachgewiesen (Leukel, 2012) (Chirasani, 2012).

Der andere Ansatz liegt bei der Erforschung der tumorinitiierenden Progenitorzellen. In *in vitro* Versuchen, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Differenzierung von BTIC, vom epithelialen Phänotyp zum mesenchymalen die Migration und Invasion ins Gewebe erst ermöglicht. Dabei zeigen epitheliale Zellen eine ausgeprägte Zell-Zell Interaktion die mesenchymale Zellen verlieren. Diese zeigen hingegen eher spindelförmigen Charakter und weisen Marker wie Vimentin und Fibronectin auf. Ausdifferenzierte Zellen (TC) zeigten in den Versuchen keine Kapazität zur Migration und Invasion (Kalluri, 2009).

Diese Dissertation sollte mit ihren gesetzten Ziel der onkologischen Arbeitsgruppe „tumorinitiierende Progenitorzellen“ weitere wichtige *in vivo* Forschungsergebnisse liefern. Das Ziel war es, die geläufige Stammzellhypothese der Pathogenese des GBM zu stützen. Es sollte gezeigt werden, dass die Fehldifferenzierung von Vorläuferzellen zur Tumorinitiierung und zum Unterhalt der Tumore führt. Durch die Implantation von Zellen eines Ursprungstumors, die einmal als differenzierte Tumorzellen, und einmal als undifferenzierte Zellen (hier BTIC) implantiert wurden, konnte ein direkter Vergleich der Tumorinduktion stattfinden. Es konnte gezeigt werden, dass die undifferenzierten Zellen eine fünfmal so hohe Tumorinduktion zeigten. Zusätzlich stellten sich die generierten Tumore bei den BTIC mit deutlich größerem Durchmesser und mit höherer Zelldichte dar, was auf eine höhere Proliferationskapazität und Malignität hinweist. Ebenfalls konnte bei allen BTIC Tumoren im Randbereich eine Migration in gesundem Gewebe gezeigt werden. Bei zwei Tumoren war ein ausgeprägtes Migrationsverhalten entlang des Balkens feststellbar.

Die hier durchgeführte Etablierung des MRT Verfahrens bei der vitalen Maus dient weiterhin den geplanten Projekten der Forschung an der Universität Regensburg. Die Anwendung des MRT wurde hierbei in Hinblick auf die Sensitivität bei der murinen Tumordetektion mit dem histologischen Nachweis von Tumoren verglichen. Neben einer Sensitivität von 62,5% konnten vor allem in Bereich von kleineren Tumoren mit negativen Kontrastmittelanreicherungen einige falsch negative Ergebnisse nachgewiesen werden. Den entscheidenden Parameter für die Sicherheit des Verfahrens stellt hierbei der Tumordurchmesser dar. Kleine Tumore konnten nur bei starken peritumoralen Ödemen detektiert werden. Eine denkbare Anwendung dieses neuen Verfahrens wäre beispielsweise ein *in vivo* Kontrolle der Tumorgröße unter Medikation, um auf diese Weise direkt den Therapieverlauf zu monitorieren.

Im Zusammenhang mit den anderen Projekten des Arbeitskreises Neuroonkologie Regensburg hat sich herausgestellt, dass Migration und Proliferation den zentralen Punkt der Malignität des GBM darstellen. Ausgangspunkt stellt eine kleine Gruppe stammzellartiger, neuraler Zellen

dar, die zu dem invasiven Wachstum, der schnellen Regression unter Therapie und der daraus resultierenden schlechten Prognose führen. Der therapeutische Ansatz gegen diese Zellen (BTIC) gilt daher als sehr vielversprechend. In Hinblick auf das Gesamtprojekt ermöglichen die Erkenntnisse dieser Arbeit eine Übertragung der *in vitro* Versuche, Migration und Proliferation zu hemmen, in ein *in vivo* nude Maus Modell.

Sie stellen somit einen weiteren wichtigen Schritt in Richtung klinische Studien und möglicher Therapien des GBMs dar.

6 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der aggressivste und am häufigsten vorkommende primäre Gehirntumor im Erwachsenenalter und wird nach der World Health Organisation (WHO) bei den Grad IV Tumoren eingeordnet. Die hohe Malignität des GBM ist vor allem bedingt durch sein infiltratives Wachstum, Migration von Zellen und dessen hohe Proliferationskapazität. Die Heterogenität und die Hierarchie der Tumorzellpopulationen bilden die Basis für die sogenannte Tumorstammzelltheorie. Laut dieser Hypothese existiert eine Untergruppe von Tumorzellen, welche den Tumor unterhält, indem sie die Fähigkeit besitzt, sich selbst erneuernd differenzierte Tumorzellen hervorzubringen. Die Tumorstammzellen im GBM, auch BTICs (*Brain tumor initiating cells*) genannt, weisen einige Charakteristika, wie adulte neurale Stammzellen auf. Hierzu gehört die Expression von Markergenen, Multipotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Aufgrund der Tumorigenität der BTICs geht man davon aus, dass diese eine spezifische und essentielle Zielpopulation für eine erfolgreiche Behandlungsstrategie darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Hypothese zu stützen. Hierzu wurde frisches GBM Gewebe, zum einen unter Stammzell-Bedingungen kultiviert, um BTIC Kulturen zu etablieren und zum anderen in serumhaltigen Medium zur Etablierung von differenzierten Tumorzellen (TCs). Die unterschiedlichen Zellen wurden orthotop in ein Nacktmausmodell implantiert. Parallel hierzu wurde ein reproduzierbares in vivo Modell, auf Basis eigener BTIC Linien sowie ein MRT basierendes Monitoring für nude Mäuse etabliert.

Untersucht wurden insgesamt 88 Tiere, hiervon 28 in den Vorversuchen. Im Hauptversuch wurden zwei Hauptgruppen mit je 30 Tieren gebildet, einmal mit Implantation von TC und einmal mit BTIC. Um zu zeigen, dass die BTICs auch bei der Implantation von einer nur kleinen Zellzahl eine hohe Tumorigenität besitzen und die TCs auch bei der Implantation einer hohen Zellzahl kaum eine Tumorigenität aufweisen, wurden je Gruppe drei Untergruppen mit jeweils 100, 1.000, 10.000 Zellen implantiert.

Anhand der bildgebenden Ergebnisse, der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen, konnte bei 52% der mit BTIC implantierten

Tiere ein Tumor festgestellt werden. Bei den mit TC implantierten Tieren wurde nur bei 8,6% ein Tumor diagnostiziert. Dies deutet darauf hin, dass auch beim GBM die Gruppe der BTIC eine zentrale Rolle für den Unterhalt und die Bildung eines Tumors spielt. Diese Ergebnisse könnten dazu dienen, künftig eine gezielte Therapie gegen diese kleine Gruppe von BTIC im Tumor zu entwickeln und somit eine Verbesserung der Prognose beim GBM Patienten erwirken.

7 Summary

Glioblastoma multiforma (GBM) is the most aggressive and frequent primary brain tumor in adulthood. Due to the high degree of malignancy and poor prognosis, this tumor type is classified as a WHO Grade IV tumor. GBM cells are characterized by infiltrative growth and a high proliferation and migration capacity.

The heterogeneous and hierarchical structure of the tumor cell population constitutes the basis for the cancer stem cell theory. According to this hypothesis a certain subpopulation of tumor cells gives rise to more differentiated tumor cells to maintain the tumor bulk.

In brain tumors these tumor stem cells, also called brain tumor initiating cells (BTICs), share common features with adult neural progenitor cells like marker gene expression, multipotency and the capacity to self-renew. Due to their tumorigenicity the BTICs are regarded as an essential target for any treatment to successfully eradicate the tumor.

The aim of this study was to demonstrate the different tumor initiating capacities of BTICs and differentiated tumor cells (TCs). First, tumor cells from freshly resected tumor material were expanded either under stem cell conditions to establish BTIC cultures or in media supplemented with serum to obtain TC cultures. Both types of cell lines were orthotopically implanted in a nude mouse model. Furthermore a reproducible in vivo model based on internal BTIC lines as well as a MRT based monitoring for nude mice was established.

Altogether, 82 mice were examined. In the main experiment, 27 mice were transplanted with BTICs and 27 mice with TCs. To compare the tumorigenic

capacity of both cell types the injection was performed in a dilution series with 100, 1000 and 10 000 cell per cell line.

MRT, histological and immunohistological analysis revealed that 52 % of mice transplanted with BTICs were diagnosed with a tumor whereas after transplantation with TCs only 8,6 % had a detectable tumor.

These results strongly support the hypothesis that BTICs play a central role in the initiation and maintenance of the tumor. Therefore, a therapeutic strategy which effectively targets this subpopulation could significantly improve the prognosis for GBM patients.

8 Ausblick

Neben einem sicher etablierten nude Maus Modell für die Implantation von hauseigenen BTIC Zelllinien konnte ein MRT Verfahren zum Monitoring der Tiere etabliert werden. In Hinblick auf das Gesamtprojekt stellen die etablierten Verfahren Grundlage für weitere *in vivo* Versuche für eine zielgerichtete Therapie gegen BTIC dar. So könnten beispielsweise im nächsten Schritt die vielversprechenden *in vitro* Versuche, Migration und Invasion Verhalten mittels knockdown von STAT3 und C/EBP β zu beeinflussen, im natürlichen Mikromilieu nachvollzogen werden.

Im Hinblick auf bildgebende Verfahren konnte eine gute Technik für ein *in vivo* Monitoring von Tumormodellen entwickelt werden. Sollte sich die Anwendung des MRT als bildgebendes Verfahren bei Mäusen vermehrt durchsetzen, wäre es sinnvoll, ein festes System in die Spule zu integrieren, um die Lagerung besser zu standardisieren.

Daneben sollten alle *in vivo* Versuche mit immundefizienten Tumormodellen in einem geschlossenen Tierhaltungssystem stattfinden.

9 Anhang

9.1 Biometrische Planung: Hirntumor initiiierende Zellen und Tumor Zellen

Tabelle 34: Statistische Berechnung G*Power

Exact - Proportions: Inequality, two independent groups (Fisher's exact test)	
Options:	Exact distribution
Analysis:	A priori: Compute required sample size
Input:	Tail(s) = Two
Proportion p1	1
Proportion p2	0.2
α err prob	0.05
Power (1- β err prob)	0.9
Output:	Sample size group 1 = 8
	Sample size group 2 = 8
	Total sample size = 16
	Actual power = 0.9437184
	Actual α = 0.004368519

9.2 Einzeldaten der Versuchstiere - Gewichtsverlauf

9.2.1.1 Hirntumor initiierende Zellen I

Tabelle 35: Gewichtsverlauf BTIC -Gruppe 1

Datum	Tag	Tiere									
		BTIC 1	BTIC 2	BTIC 3	BTIC 4	BTIC 5	BTIC 6	BTIC 7	BTIC 8	BTIC 9	BTIC 10
09.01.	1	26,2	27,4	24,1	25,4	28,1	27	29,7	25,7	30,9	26,8
11.01.	2	25,4	26,5	23,5	24,3	27,7	26,6	28,9	24,7	30,6	25,7
12.01.	3	26,5	27,8	23,34	23,75	28,2	26,7	28,9	23,8	28,9	26,1
13.01.	4	27,4	27,1	23,2	24,8	26,5	26,6	28,8	/	29,1	26,2
14.01.	5	28,2	26,4	23,5	28,3	24,6	26,8	29,1		29,2	26,14
15.01.	6	27,1	27,9	23,1	27,1	27,4	26,5	26,5		28,9	26,2
16.01.	7	26,2	28,6	22,8	25,04	28,4	26,7	25,16		28,58	25,94
17.01.	8	27,37	28,79	23,7	25,9	29	27,68	25		29,7	26,35
18.01.	9	27,6	28,5	23,4	25,7	28,8	27,8	24,8		29,5	26,5
19.01.	10	26,87	28,5	23,2	25,4	27,2	27,3	24,59		29,2	26,4
20.01.	11	26,2	28,1	22,9	25,26	27,56	26,4	24,3		28,3	25,6
21.01.	12	26,9	28,4	23,1	26,1	27,3	27,1	23,7		28,4	25,8
22.01.	13	27,24	28,6	23,4	26,41	26,89	27,24	23,84		28,47	26,2
23.01.	14	26,81	28,35	23,15	26,32	26,83	26,47	23,5		28,24	26,01
24.01.	15	26,99	28	23,75	26,95	27,4	26,87	23,73		28,32	26,37
25.01.	16	27,42	28,03	23,97	27,66	27,87	26,38	24,02		28,41	26,62
26.01.	17	27,2	28,2	23,8	27,8	27,1	27	22,9		28,1	26,9
28.01.	19	27,3	28,1	23,9	27,2	26,9	27,2	22,8		28,5	27,4
30.01.	21	27,19	27,89	23,6	27,85	27,2	27,4	22,53		28,4	27,3
01.02.	23	28,16	28,71	24,36	29,23	28,02	28,07	23,98		28,69	27,28
03.02.	25	28,03	27,95	24,23	28,81	27,82	27,8	23,91		28,81	26,65
06.02.	28	28,4	29,19	25,04	29,68	28,91	28,64	25,35		29,68	27,38
08.02.	30	24,65	25,8	22,67	24,7	23,2	25	22,29		25,73	22,66
09.02.	31	27,5	28,25	24,19	28	26,9	27,35	23,24		28,46	25,81
10.02.	32	27,61	26,95	24,48	28,32	26,58	27,59	24,51		29,44	25,31
13.02.	34	27,6	27,29	24,68	28,11	26,48	27,81	25,15		27,49	25,74
15.02.	36	28,03	29,26	24,78	28,77	27,06	27,07	25,54		29,21	26,3
17.02.	38	28,66	28,25	24,77	29,35	26,51	27,31	25,37		27,91	26,28
19.02.	40	29	29,21	25	30,12	24,62	27,41	25,5		28,95	27,49
21.02.	42	29,9	30,2	25,2	30,4	24,2	27,7	25,8		28,9	28,2
23.02.	44	28,96	30,48	25,43	31,37	25,02	27,67	25,47		30,61	28,28
25.02.	46	29,72	30	25,57	30,7	24,63	27,84	25,55		31,01	27,51
26.02.	47	29,5	30,16	25,44	30,28	24,81	27,9	25,66		29,97	28,03
27.02.	48	30,31	30,69	26,17	30	25,52	28,86	26,21		30,29	28,6

28.02	49	29,5	30,53	25,57	30,04	24,4	28,3	25,63		30,6	27,7
29.02	50	29,93	30,5	25,9	30,46	24,71	28,01	25,2		31,06	27,42
01.03	51	30,67	32,37	26,36	31,52	23,68	28,81	25,96		31,26	28,41
02.03	52	29,65	31,15	26,22	30,71	24,18	28,57	25,61		30,95	27,97
03.03	53	29,56	31,58	26,41	30,1	24,5	28,97	26,54		30,8	27,85
04.03	54	29,77	32,43	26,42	30,36	24,72	29,21	26,12		31,51	27,87
05.03	55	28,72	30,12	25,99	29,29	24,07	28,35	25,36		/	26,86
06.03	56	29,21	30,23	26,01	30,15	/	/	26,45			27,61
07.03	57	30,02	30,02	25,97	29,93			26,34			27,57
08.03	58	29,98	29,91	26,2	30,32			25,98			28,45
09.03	59	29,85	30,15	25,99	30,22			26,12			28,4
10.03	60	29,74	31	26,07	30,54			26,43			26,9
11.03	61	29,99	30,64	26,01	30,1			26,44			27,38
12.03	62	30,83	32,07	26,92	31,9			27,53			27,84
13.03	63	30,75	31,65	26,61	30,89			26,55			28,24
14.03	64	30,09	31,58	25,82	30,08			26,18			27,45
15.03	65	31,82	32,48	26,58	30,49			26,43			27,7
16.03	66	30,16	30,68	25,84	30,57			25,79			26,17
17.03	67	29,96	30,31	26,57	31,52			24,78			27,05
18.03	68	30,49	29,22	25,88	29,96			25,16			27,61
19.03	69	29,14	29,48	25,16	29,74			25,17			27,03
20.03	70	29,9	28,33	26,29	30,26			24,46			27,36
21.03	71	30,02	29,74	26,31	31,46			24,96			27,47
22.03	72	29,7	28,66	25,77	30,6			25,35			27,47
23.03	73	30,6	/	26,03	30,24			26,45			27,32
24.03	74	30,94		26,32	30,16			26,32			27,67
25.03	75	30,78		26,61	30,48			26,51			28,18
26.03	76	30,4		25,75	30,38			25,57			27,96
27.03	77	29,98		26,36	30,01			26,16			28,15
28.03	78	31,03		25,92	30,26			26,27			28,58

Tiere, die frühzeitig aufgrund von Auffälligkeiten beendet wurden, sind mit „/“ gekennzeichnet

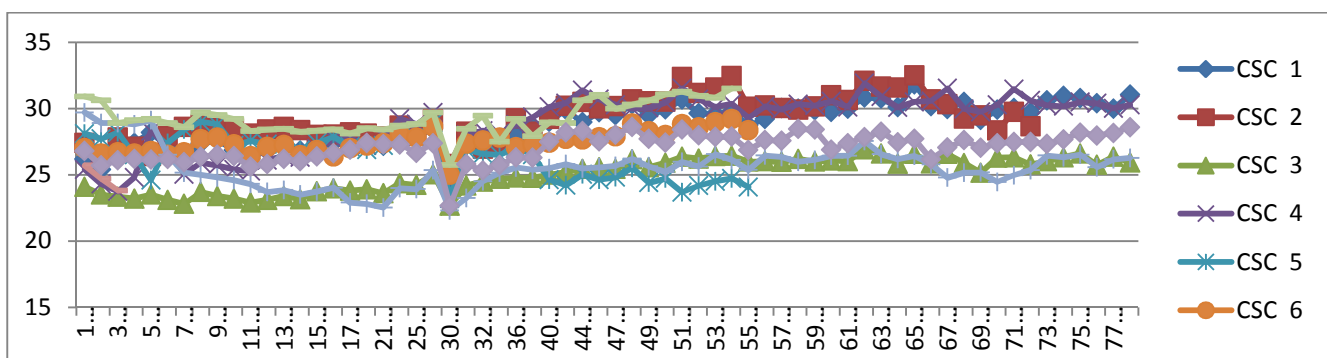


Abbildung 36: Diagrammformiger Gewichtsverlauf BTIC I

9.2.1.2 Hirntumor initiiierende Zellen II

Tabelle 36: Gewichtsverlauf BTIC-Gruppe II

Datum	Tag	Tiere									
		BTIC 11	BTIC 12	BTIC 13	BTIC 14	BTIC 15	BTIC 16	BTIC 17	BTIC 18	BTIC 19	BTIC 20
11.01.	1	28,7	27,8	27,2	25,8	25,5	25,6	25,1	27,2	25,2	27,3
12.01.	2	27,7	26,72	25,77	25,9	26,15	24,9	24,45	27,19	24,65	26,1
13.01.	3	27,69	27,1	25,5	26,1	26,2	24,6	24,3	26,9	24,9	26,3
14.01.	4	27,71	27,28	25,2	26,25	26,2	24,09	23,79	26,2	25,1	26,4
15.01.	5	27,61	27,1	24,9	26,1	26,1	24,35	23,6	26,4	24,8	26,1
16.01.	6	27,46	26,78	24,4	26,52	26,3	24,47	23,53	26,52	24,6	25,9
17.01.	7	28,1	27,49	24,2	27,5	26,67	24,64	24,15	26,75	25,45	26,04
18.01.	8	27,7	27,4	23,5	27,1	27	24,9	23,6	26,6	25,1	26,2
19.01.	9	27,57	27,09	23,48	26,7	25,7	25,29	23,58	26,62	25,2	25,47
20.01.	10	27,18	26,5	22,72	22,89	25,22	24,33	22,9	25,83	24,2	25,72
21.01	11	27,4	27,03	23,4	23	25,3	24,6	23,1	26,4	24,3	26,1
22.01	12	27,5	27,1	23,82	23,4	25,8	25,6	23,44	27,05	24,8	26,47
23.01	13	27,22	26,05	22,23	24,24	25,4	26,44	23,32	26,75	24,5	26,21
24.01	14	28,13	26,45	24,03	26,3	25,21	26,46	24,16	26,73	24,89	26,55
25.01	15	27,22	25,84	23,73	26,79	25,01	26,71	23,6	26,69	24,3	26,54
26.01	16	28,1	25,9	24,2	26,94	25,89	26,85	23,94	27,2	24,69	26,1
28.01	18	28,7	26,5	25,5	27,1	26,3	27,3	24,3	27,4	25,3	26,25
30.01	20	29	26,49	25,64	26,8	26,54	27,18	24,66	27,02	25,19	26,55
01.02	22	29,15	26,51	25,6	27,44	26,38	28,1	25,65	27,72	25,3	28,29
03.02	24	28,23	26,42	27,03	27,08	26,59	28,23	25,13	27,11	25,45	27,89
06.02	27	29,09	26,11	28,44	26,63	27,36	25,39	25,94	27,96	28,28	29,38
08.02	29	26,47	24,36	23,75	22,83	25,22	25,91	22,43	25,02	23,31	25,74
09.02	30	27,98	25,52	25,61	24,62	26,82	26,95	24,88	27,17	25,21	27,18
10.02	31	27,47	26,29	24,88	24,49	26,52	27,08	24,53	26,93	25	27,62
13.02	34	28,05	24,43	25,89	24,87	24,97	27,26	24,06	26,99	24,66	26,85
15.02	36	27,63	24,15	24,01	25,32	25,04	27,29	24,49	25,22	24,3	27,15
17.02	38	27,38	23,91	25,18	25,89	23,8	27,77	24,59	24,62	24,75	27,27
19.02	40	26,77	24,53	25,54	26,73	22,92	26,74	25,14	23,61	24,76	27,97
21.02	42	23,1	25,3	26	27,42	22,2	25,8	25,4	27	25,1	28,3
23.02	44	22,41	26,09	26,62	27,94	22,09	28	26,03	27,77	24,92	28,93
25.02	45	25,5	25,81	27,17	27,57	20,96	28,3	25,6	27,46	24	28,33
26.02	46	24,76	25,7	26,56	27,44	20,15	27,2	24,67	26,88	23,96	28,55
27.02	47	26,37	26,84	27,84	28,42	19,95	28,49	25,84	28,27	24,52	30,11
28.02	48	24,9	25,46	26,44	27,03	/	26,03	24,43	26,35	21,86	28,61
29.02	49	25,34	25,84	26,14	26,48		26,68	24,56	26,41	21,24	28,38
01.03	50	27,85	27,11	28,02	28,5		28,15	25,14	28,53	21,06	29,69

02.03	51	26,88	26,79	27,55	27,15		27,32	24,95	27,85	/	29,18
03.03	52	27,1	26,87	27,21	27,02		26,98	25,52	27,45		29,1
04.03	53	27,3	26,9	27,38	26,4		26,24	25,04	27,56		28,52
05.03	54	26,25	26,13	26,5	25,39		25,36	24,57	26,77		27,91
06.03	55	26	26	27	25		26	25	29		28
07.03	56	26,84	26,3	26,2	25		25,83	24,8	27,43		28,14
08.03	57	28,56	27,42	27,15	25,81		27,04	24,42	28,43		29,21
09.03	58	27,89	26,9	27,05	25,7		26,88	24,91	28,15		29,04
10.03	59	27,77	26,45	26,71	24,31		26,03	22,45	28,97		27,09
11.03	60	27,31	25,68	26,98	24,09		26,37	22,6	28,36		27,42
12.03	61	29,09	27,18	27,83	24,85		26,24	23,83	29,08		29,08
13.03	62	29,89	25,4	27,22	23,95		26,14	23,32	29,65		28,4
14.03	63	27,85	25,21	26,78	22,93		24,87	22,68	28,2		28,39
15.03	64	29,22	26,05	26,99	22,91		26,17	23,26	28,68		29,83
16.03	65	26,72	24,67	26,39	21,57		26,13	20,79	27,32		28,97
17.03	66	26,83	24,41	26,75	20,95		26,07	21,36	26,94		28,89
18.03	67	27,55	24,27	26,33	20,58		26,13	21,47	26,95		28,74
19.03	68	26,97	24,01	26,91	/		26,34	21,31	26,35		29,1
20.03	69	26,81	23,79	26,91			25,48	21,17	26,19		28,77
21.03	70	27,39	23,71	26,63			25,6	21,41	26,25		29,1
22.03	71	27,86	24,18	27,35			26,19	22,4	26,27		29,82
23.03	72	27,87	24,01	27,79			25,5	20,68	25,25		29,66
24.03	73	27,43	25,01	26,98			26,13	20,97	26,16		29,23

Tiere, die frühzeitig aufgrund von Auffälligkeiten beendet wurden, sind mit „/“ gekennzeichnet

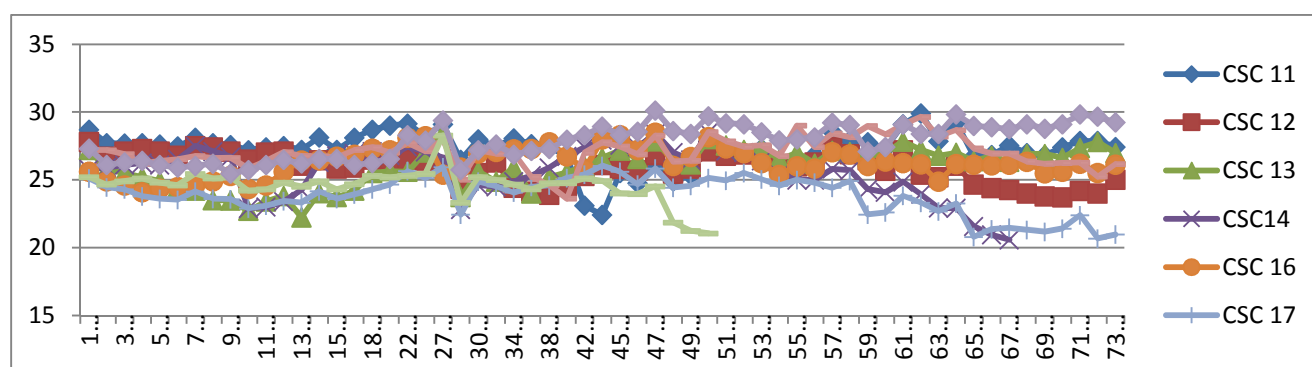


Abbildung 37: Diagrammförmiger Gewichtsverlauf BTIC II

9.2.1.3 Hirntumor initiiierende Zellen III

Tabelle 37: Gewichtsverlauf BTIC-Gruppe III

Datum	Tag	Tiere									
		BTIC 21	BTIC 22	BTIC 23	BTIC 24	BTIC 25	BTIC 26	BTIC 27	BTIC 28	BTIC 29	BTIC 30
13.01.	1	30	25,4	31,5	27,4	26,6	28,2	30	30,5	29,5	28,3
14.01.	2	29,7	25,4	30,9	28,2	27,2	29,7	28,2	29,5	27,35	27,1
15.01.	3	28,1	25,5	30,1	28,2	26,5	28,6	27,6	27,2	27,32	26,5
16.01.	4	26,88	25,49	29,8	27,53	25,38	28,04	26,05	25,45	27,4	21,35
17.01.	5	24,4	25,58	30,8	27,8	26,03	30,06	25,23	25,85	27,63	21,43
18.01.	6	26,8	25,4	30,9	27,6	26,3	29,9	25,3	26,2	28,1	21,3
19.01.	7	26,52	25,52	30,2	27,4	26,4	29,7	24,5	26,5	27,42	21,41
20.01.	8	26,11	25,1	29,82	26,86	25,87	28,86	24,3	26,63	26,65	21,24
21.01.	9	26,3	25,15	30,1	26,9	25,7	28,2	24,2	26,7	26,3	21,5
22.01.	10	26,57	25,2	30,31	27,14	25,87	28,14	24,7	26,95	26,49	21,7
23.01.	11	26,62	24,93	30,22	26,43	26,01	27,9	24,81	26,65	25,87	21,66
24.01.	12	28,2	26,03	30,93	27,45	26,53	28,86	24,94	27,99	26,34	22,02
25.01.	13	29,13	25,9	30,3	26,79	27,03	28,19	24,55	27,54	25,75	21,84
26.01.	14	29,5	25,81	30,12	26,89	27,45	28,98	25,5	27,98	24,5	22,01
28.01.	16	29,5	26,5	29,98	27,5	27,5	28,5	26	28,2	24,1	22,2
30.01.	18	29,66	26,1	30,49	27,03	26,96	28,74	26,6	28,4	23,44	22,7
01.02.	20	28,8	26,51	30,68	26,64	27,16	28,99	26,21	29,68	23,31	22,51
03.02.	22	29,05	27,12	30,35	27,71	28,26	28,46	27,08	29,4	23,64	18,71
06.02.	25	29,47	27,49	30,53	27,3	27,43	28,44	26,5	29,28	24,32	21,03
08.02.	27	28,84	27,31	30,41	28,12	27	28,21	26,49	29,3	22,93	20,91
10.02.	29	29,65	27	30,19	29,28	25,49	28,78	27,44	28,94	22,89	21,63
13.02.	31	30,49	27,3	30,66	29,74	25,57	28,1	27,28	25,55	21,26	21,4
15.02.	33	29,89	27,07	30,61	29,55	26,31	28,02	27,15	29,09	20,79	21,01
17.02.	35	30,77	26,82	31,15	29,83	25,83	28,06	26,66	29,9	20,27	20,49
19.02.	37	30,68	24,38	30,85	29,52	26,15	28,71	26,25	30	19,83	20,53
20.02.	38	30,31	24,59	30,48	28,81	25,71	28,23	25,81	30,22	19,93	20,43
21.02.	39	30,3	24,7	31,1	30,1	25,8	29,1	25,8	30,5	19,5	20,2
23.02.	41	29,53	24,37	30,48	29,78	24,48	28,14	25,45	30,25	18,49	20,73
24.02.	42	28,74	23,88	30,49	29,7	/	28,3	24,18	30,66	/	20,07
25.02.	43	28,67	24,44	31,15	30,26		28,34	23,48	31,06		20,7
26.02.	44	27,79	24,46	30,64	30,06		28,26	22,17	30,09		19,59
27.02.	45	28,9	25,08	32,21	29,78		29,13	21,53	31,43		19,26
28.02.	46	26,86	23,76	30,94	30,9		28,3	/	30,23		18,45
29.02.	47	26,07	23,07	30,86	30,13		28,17		30,4		18,43
01.03.	48	26,32	23,43	31,75	31,14		29,01		31,38		18,01
02.03.	49	/	/	31,11	30,96		28,85		31,16		/

03.03	50			31,35	30,53		29,86		32		
04.03	51			31,46	30,69		29,94		31,03		
05.03	52			30,57	30,49		28,32		30,24		
06.03	53			30	30		28		30		
07.03	54			30,85	30,27		28		29,58		
08.03	55			31	30,85		28,87		30,35		
09.03	56			30,95	30,67		28,91		30,16		
10.03	57			30,97	30,08		27,9		31,54		
11.03	58			30,73	29,81		27,62		30,97		
12.03	59			31,27	30,3		28,21		32,01		
13.03	60			31,58	30,15		28,14		31,33		
14.03	61			30,49	30,36		27,18		31		
15.03	62			30,57	30,46		27,09		31,84		
16.03	63			30,11	30,57		26,48		30,78		
17.03	64			30,45	30,92		26,65		31,76		
18.03	65			30,23	30,39		26,1		31,31		
19.03	66			30,98	30,21		25,98		31,03		
20.03	67			30,36	31,05		25,35		30,44		
21.03	68			32,12	30,7		25,4		31,05		
22.03	69			31,45	31,38		24,92		31,94		
23.03	70			31,34	31,6		23,69		32,45		
24.03	71			30,98	31,2		22,74		32,96		
25.03	72			31,41	31,57		21,93		31,8		
26.03	73			31,37	31,96		/		32,33		
27.03	74			31,17	31,82				31,89		
28.03	75			31,56	31,98				32,78		

Tiere, die frühzeitig aufgrund von Auffälligkeiten beendet wurden, sind mit „/“ gekennzeichnet

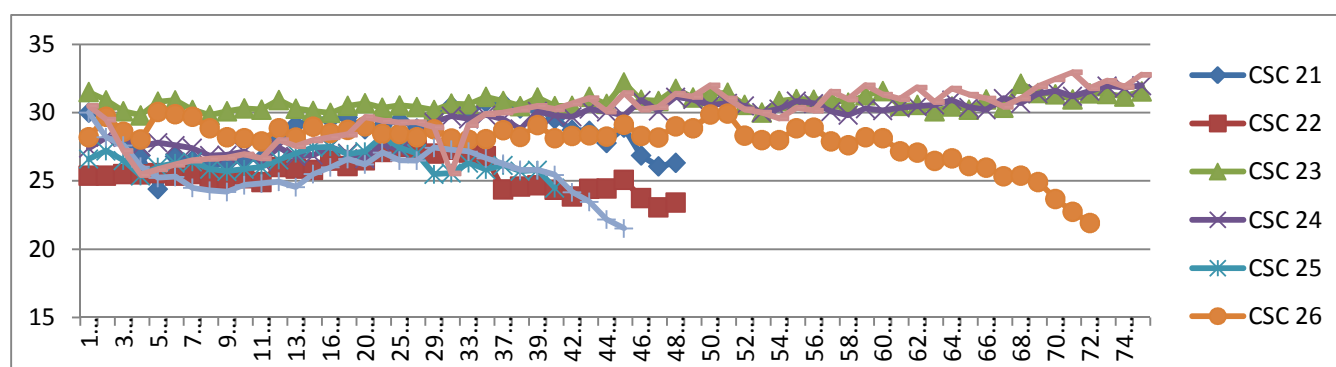


Abbildung 38: Diagrammförmiger Gewichtsverlauf BTIC III

9.2.1.4 Tumorzellen I

Tabelle 38: Gewichtsverlauf TC-Gruppe I

Datum	Tag	Tiere									
		TC 1	TC 2	TC 3	TC 4	TC 5	TC 6	TC 7	TC 8	TC 9	TC 10
16.02	1	29,6	28,7	24,1	29,7	/	26,5	23,6	27,4	/	28,4
17.02	2	27,85	27,5	23,05	27,25		24,94	23,4	26,53		27,48
18.02	3	27,97	27,01	23,53	27,21		26,85	23,85	26,73		27,39
19.02	4	28,01	27,74	23,91	27,41		26,5	23,85	26,83		27,8
20.02	5	28,11	27,75	25,02	26,71		26,54	24,06	26,97		28,99
21.02	6	28,4	27,6	25,8	26,9		26,7	23,5	27,6		29,2
22.02	7	28,36	27,06	25,7	27,13		26,21	23,34	27,54		28,98
23.02	8	27,38	27,07	25,78	27,37		26,3	23,67	27,38		29,02
24.02	9	27,45	27,47	26,05	27,46		26,04	24,54	27,6		29,74
25.02	10	27,61	27,09	26,98	27,03		27,01	25,31	27,85		28,99
26.02	11	27,41	26,96	26,55	28,62		25,55	23,86	27,49		30,13
27.02	12	27,54	27,39	27,68	29,15		26,2	24,01	28,55		30,51
28.02	13	27,3	27,4	27,16	28,27		26,2	23,06	28,08		30,31
29.02	14	26,75	27,02	27,47	28,85		26,29	23,14	27,85		30,55
01.03	15	27,38	28,02	29,03	29,14		26,17	23,05	28,34		30,73
02.03	16	27,72	27,91	28,55	29,05		26,4	23,55	27,91		30,56
03.03	17	26,89	27,23	28,78	27,9		27,5	23,75	28,2		30,19
04.03	18	25,72	27,13	28,59	26,92		26,52	23,58	28,21		30,93
05.03	19	26,55	28,01	26,87	28,45		26,56	24,21	27,42		29,88
06.03	20	25,14	28,75	26,45	28,74		26,04	24,17	27,89		30,08
07.03	21	26,82	27,96	24,99	28,84		26,58	24,25	27,42		30,12
08.03	22	26,66	27,67	24,98	27,53		26,58	24,21	27,61		29,61
09.03	23	26,86	28,11	25,51	28,02		27,05	24,46	27,58		30,15
10.03	24	27,01	26,34	23,9	27,53		27,97	24,78	27,51		29,98
11.03	25	27,68	26,23	24,35	28,23		28,07	24,21	28,75		30,34
12.03	26	27,97	27,21	23,51	27,8		28,47	25,23	28,33		30,84
13.03	27	27,6	25,85	23,19	28,21		27,85	24,85	28,17		30,95
14.03	28	27,47	24,85	23,04	27,36		27,33	24,51	27,93		31,16
15.03	29	28,15	25,22	25,25	27,46		28,02	25,12	28,85		31,51
16.03	30	27,24	27,27	24,94	27,97		24,48	25,14	27,95		30,97
17.03.	31	27,81	27,2	25,29	27,81		26,16	25,2	27,48		31,07
18.03	32	27,95	27,68	25,03	27,72		25,95	26,01	27,68		30,89
19.03	33	26,99	27,04	25,34	27,43		25,97	24,99	27,13		30,79
20.03	34	27,66	27,22	26,33	27,89		22,94	25,71	27,95		30,97
21.03	35	28,32	27,74	26,78	28,24		23,22	26,05	28,09		28,92
22.03	36	27,59	26,33	25,06	27,85		22,58	25,09	26,86		26,84
23.03	37	27,72	27,96	25,93	28,26		/	26,35	27,9		30,4

24.03	38	27,13	28,01	26,31	28,45			26,3	28,37		31,02
25.03	39	26,42	28,53	26,29	28,96			26,84	29,05		30,71
26.03	40	26,37	28,26	27,04	28,86			26,49	28,52		30,37
27.03	41	27,47	27,88	26,15	28,52			26,5	28,26		29,03
28.03	42	28,58	28,15	26,88	29,18			26,48	28,78		29,81
29.03	43	28,45	27,87	27,21	28,67			26,42	28,45		28,73
30.03	44	27,59	28,24	26,96	28,24			26,12	28,91		28,14
31.03	45	27,66	28,51	27,11	28,42			26,45	28,97		27,62
01.04	46	27,92	28,42	26,45	27,5			26,47	28,72		28,16
02.04	47	27,4	28,75	25,32	27,23			26,46	26,34		28,89
03.04	48	26,79	28,71	24,04	26,75			25,77	24,64		27,52
04.04	49	28,2	28,57	24,62	27,56			25,79	26,17		28,18
05.04	50	28,31	28,71	25,41	27,01			26,01	27,06		26,31
06.04	51	27,99	28,13	25,71	26,57			25,74	27,3		22,12
07.04	52	28,07	28,81	24,68	26,94			26,24	27,41		/
08.04	53	28,72	28,8	24,9	26,4			26,39	25,97		
09.04	54	29,12	28,52	24,17	25,52			26,82	25,83		
10.04	55	29,11	28,58	24,51	26,07			27,18	25,2		
11.04	56	29,47	28,17	24,89	27,14			27,44	24,41		
12.04	57	28,99	27,6	23,97	26,43			26,67	24,2		
13.04	58	28,1	26,7	23,6	26,06			26,34	24,15		
14.04	59	28,82	27,61	23,76	25,88			27,27	24,51		
15.04	60	27,97	27,31	23,16	25,63			27,46	24,61		
16.04	61	26,43	26,81	22,94	25,57			27,13	23,43		
17.04	62	23,8	27,75	27,41	26,07			26,7	22,10		
18.04	63	24,41	26,14	22,46	26,39			25,03	20,4		
19.04	64	24,94	25,62	22,52	26,52			26,43	20,2		
20.04	65	24,63	24,79	21,73	26,3			26,68	/		
21.04	66	24,36	25,25	21,73	25,81			26,73			
22.04	67	23,71	24,43	20,42	26,32			26,36			
23.04	68	23,59	24,2	19,5	25,89			26,51			
24.04	69	23,40	23,74	/	26,84			26,17			
25.04	70	22,46	21,91		25,94			24,7			

Tiere, die frühzeitig aufgrund von Auffälligkeiten beendet wurden, sind mit „/“ gekennzeichnet

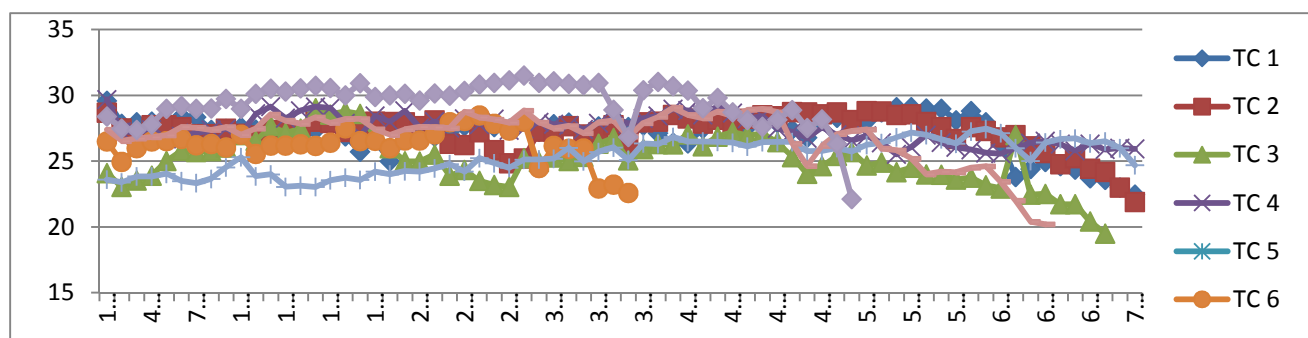


Abbildung 39: Diagrammformiger Gewichtsverlauf TC I

9.2.1.5 Tumorzellen II

Tabelle 39: Gewichtsverlauf TC-Gruppe II

Datum	Tag	Tiere									
		TC 11	TC 12	TC 13	TC 14	TC 15	TC 16	TC 17	TC 18	TC 19	TC 20
17.02	1	29,1	29,7	34,2	29,6	32,9	26,4	27,1	25,7	/	27,2
18.02	2	27,68	27,85	31,54	27,91	29,07	25,83	26,03	24,83		26,3
19.02	3	28,09	27,96	31,75	28,51	30,11	26,06	26,86	25,57		26,67
20.02	4	27,67	27,11	31,09	28,08	28,98	25,92	26,77	24,92		26,31
21.02	5	28,8	28,6	32,3	29,2	30,8	26,4	27,3	25,6		28,2
22.02	6	28,42	28,34	32,4	29	30,52	26,41	27,49	25,56		27,94
23.02	7	28,85	28,09	31,99	28,53	30,3	26,15	27,92	25,54		28,65
24.02	8	29,79	28,43	31,6	28,55	30,33	26,08	27,9	25,22		28,93
25.02	9	29,31	28,14	31,96	28,6	29,95	26,41	27,59	26,04		29,03
26.02	10	29,94	27,93	30,51	28,45	30,31	25,02	26,09	24,79		27,24
27.02	11	30,07	28,32	31,13	28,06	30,72	26,15	26	25,42		28,52
28.02	12	29,94	27,74	30,83	28	30,18	25,67	26,15	25,08		28,79
29.02	13	29,39	27,56	30,58	28,02	30,03	25,26	25,8	24,43		28,16
01.03	14	31,3	28,64	32,28	28,19	30,78	26,34	25,93	24,71		28,76
02.03	15	29,85	28,15	31,95	28,15	30,1	25,88	26,08	25,01		28,1
03.03	16	30,98	28,94	30,89	27,05	30,8	26,2	25,01	25,89		28,5
04.03	17	31,16	28,11	30,3	27,78	29,96	25,54	23,84	24,43		28,41
05.03	18	30,12	28,26	29,85	28,01	30,04	25,25	23,31	24,67		28,02
06.03	19	30,15	29,85	30,84	28,14	30,18	26,74	23,10	25,17		27,01
07.03	20	29,33	28,44	29,26	28,02	30,14	25,82	22,53	25,64		27,32
08.03	21	29,84	28,84	30,58	28,51	31,04	26,2	22,65	25,66		28,27
09.03	22	30,09	29,06	30,22	28,86	30,22	25,96	22,72	25,78		28,16
10.03	23	29,23	28,34	29,78	27,98	29,49	26,98	22,83	26,02		27,97
11.03	24	30,34	29,7	29,97	28,87	29,67	26,77	22,83	25,32		28,33

12.03	25	29,94	29,93	30,6	29,42	30,17	28,25	23,19	26,47		28,33
13.03	26	30,48	29,97	31,49	29,27	29,98	25,98	25,98	24,76		28,69
14.03	27	29,25	28,87	30,9	28,78	29,93	25,31	23,15	24,8		28,06
15.03	28	30,21	29,28	31,94	29,32	30,01	23,74	23,34	25,44		29,94
16.03	29	29,97	29,63	31,16	29,08	30,08	23,41	22,49	25,04		27,72
17.03	30	30,22	28,88	31,75	29,23	30,33	24,18	22,62	25,26		27,8
18.03	31	30,54	29,25	31,84	29,84	30,71	24,65	22,75	25,84		28,21
19.03	32	29,63	29,41	31,45	29,57	29,99	24,78	22,76	25,41		26,98
20.03	33	28,03	30,98	31,83	30,96	30,79	23,96	22,84	25,61		25,62
21.03	34	27,65	30,71	31,88	30	30,83	24,38	23,69	25,94		24,13
22.03	35	27,41	30,35	32,49	30,48	30,87	25,11	23,68	26,3		22,43
23.03	36	27,24	30,01	32,35	31,86	31,71	25,09	24,83	27,18		/
24.03	37	27,13	30,63	32,17	31,74	31,95	25,34	24,97	27,14		
25.03	38	26,78	30,53	32,55	32,81	32,35	25,17	25,34	27,53		
26.03	39	26,07	30,56	31,95	32,93	32,38	25,52	25,21	26,97		
27.03	40	26,43	31,14	32,33	33,28	32,17	25,5	24,46	27,54		
28.03	41	27,04	30,80	33,85	34,74	32,70	26,15	26,21	28,34		
29.03	42	27,42	29,85	32,86	32,99	31,78	27,12	25,98	27,89		
30.03	43	27,14	30,51	33,01	33,28	31,29	26,45	24,98	27,12		
31.03	44	27,6	29,57	32,47	32,23	30,92	26,22	24,22	26,38		
01.04	45	25,08	/	31,05	31,27	30,61	26,74	24,71	26,42		
02.04	46	22,51		32,7	32,49	31,4	26,78	25,66	27,75		
03.04	47	/		31,45	31,66	31,34	26,55	24,86	26,9		
04.04	48			32,28	32,23	31,53	26,52	25,45	27,31		
05.04	49			31,91	32,61	31,27	26,38	25,41	27,46		
06.04	50			31,88	31,51	30,45	26,37	24,87	27,23		
07.04	51			32,07	31,84	31,27	26,05	25,55	27,82		
08.04	52			32,74	32	31,94	26,47	25,74	27,01		
09.04	53			32,23	31,74	31,74	26,04	26,02	27,2		
10.04	54			33,39	31,39	31,83	25,35	25,72	27,54		
11.04	56			31,28	30,41	31,90	25,72	25,09	25,27		
12.04	57			33,94	32,04	33,88	25,1	26,22	27,28		
13.04	58			32,94	31,15	33,38	24,49	26,98	27,6		
14.04	59			32,6	31,63	32,94	24,44	28,3	27,98		
15.04	60			33,1	31,96	32,61	24,07	28,06	27,24		
16.04	61			32,65	32,31	32,75	23,81	28,2	27,71		
17.04	62			31,20	31,91	32,08	23,74	27,04	29,84		
18.04	63			31,6	30,9	31,29	23,81	28,34	26,43		
19.04	64			32,09	31,18	32,63	23,64	28,72	26,9		
20.04	65			31,48	31,74	31,9	22,84	28,55	26,85		
21.04	66			31,2	30,97	31,37	22,13	28,05	27,53		
22.04	67			30,71	31,63	31,03	/	27,65	26,74		
23.04	68			30,85	31,35	31,5		26,76	26,78		

24.04	69			32,24	31,20	32,84		27,81	27,17		
25.04	70			31,3	30,09	31,53		26,74	27,14		
26.04	71			31,54	30,44	28,42		26,8	27,98		
27.04	72			32,03	30,69	26,36		26,11	28,92		

Tiere, die frühzeitig aufgrund von Auffälligkeiten beendet wurden, sind mit „/“ gekennzeichnet

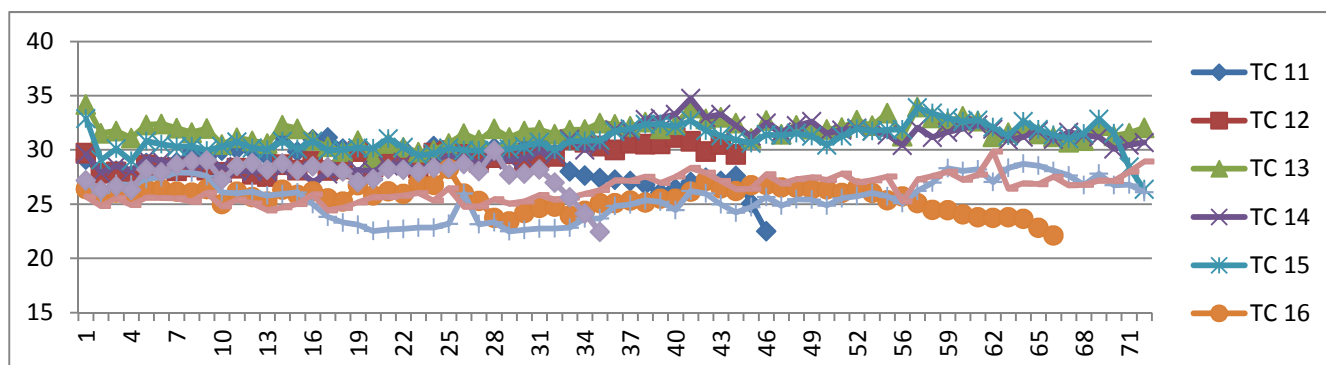


Abbildung 40: Diagrammformiger Gewichtsverlauf TC II

9.2.1.6 Tumorzellen III

Tabelle 40: Gewichtsverlauf TC-Gruppe III

Datum	Tag	Tiere									
		TC 21	TC 22	TC 23	TC 24	TC 25	TC 26	TC 27	TC 28	TC 29	TC 30
20.02	1	28,6	25,1	31,2	28,9	28,2	29,4	29,7	29,8	/	29,2
21.02	2	27,7	25,7	29,3	26,3	26,2	26,1	27,2	28,8		27,8
22.02	3	29,44	26,44	30,18	26,53	25,19	26,26	27,4	29,16		27,86
23.02	4	28,46	26,19	30,52	27,01	25,43	25,77	27,32	29,46		28,03
24.02	5	29,49	27,72	30,79	28,05	25,79	26,06	28,28	31,33		28,71
25.02	6	29,1	26,98	30,21	27,98	25,97	26,34	27,98	30,91		28,83
26.02	7	28,99	27,9	30,09	27,64	25,68	25,92	28,52	31,77		28,68
27.02	8	29,12	28,08	30,47	28,53	25,53	25,96	29,07	32,05		28,06
28.02	9	29,35	27,82	30,66	27,7	25,66	25,5	28,52	31,06		28,07
29.02	10	29,75	27,8	30,7	27,97	25,83	25,03	28,53	31,1		27,88
01.03	11	29,69	28,38	31,1	29,06	25,49	25,09	28,82	31,29		28,12
02.03	12	30,01	27,85	30,65	28,41	25,55	25,81	28,02	31,15		27,95
03.03	13	30,98	27,1	31,2	28,98	25,9	25,54	28,71	30,8		27,58
04.03	14	31,26	26,06	31,27	28,02	26,21	24,93	28,42	29,38		27,92
05.03	15	30,68	26,61	30,97	28,41	26,31	25,31	28,03	29,91		27,27
06.03	16	30,45	26,75	31,75	27,15	26,81	25,24	27,04	30,94		27,41
07.03	17	30,58	26,4	31,27	27,62	26,58	25,6	27,13	30,37		27,54
08.03	18	30,82	27,75	31,28	28,11	26,66	26,15	28,82	30,95		27,45

09.03	19	30,42	26,98	31,38	28,05	26,88	25,96	28,06	30,18		27,68
10.03	20	30,04	26,97	30,57	25,78	26,01	25,04	28,63	30,06		26,99
11.03	21	30,72	26,83	30,87	26,67	25,76	25,15	28,1	30,48		26,76
12.03	22	31,07	26,92	31	25,43	25,83	/	28,88	30,6		27,68
13.03	23	32,45	27,42	31,83	27,07	26,27		28,79	29,54		26,83
14.03	24	30,92	26,41	31,4	26,45	25,5		28,69	30,29		26,84
15.03	25	31,28	26,65	31,5	27,48	25		29,41	30,01		27,09
16.03	26	30,85	26,59	30,97	27,57	25,47		27,92	29,44		26,86
17.03	27	31,14	27,71	31,46	27,73	25,94		28,69	30,29		27,23
18.03	28	31,13	27,06	30,87	27,84	26,05		28,37	29,99		27,89
19.03	29	30,67	26,84	30,54	27,13	25,63		28,32	29,41		27,08
20.03	30	30,3	25,19	30,56	27,48	25,8		28,02	28,33		26,96
21.03	31	29,82	24,63	30,74	27,71	25,73		27,84	28,19		27,85
22.03	32	29,39	24,07	30,99	27,88	25,54		27,56	27,65		27,25
23.03	33	29,04	23,54	30,58	27,94	26,3		28,48	28,85		27,33
24.03	34	29,43	22,47	29,98	28,13	26,43		28,18	28,37		27,17
25.03	35	29,17	21,58	29,25	28,04	26,22		28,29	28,48		27,45
26.03	36	29,29	/	28,27	27,91	25,93		28,17	28,27		27,31
27.03	37	27,57		28,46	27,8	25,89		27,91	27,78		27,03
28.03	38	28,04		30,18	29,84	27,91		27,37	27,09		27,25
29.03	39	28,12		30,12	28,45	27,1		27,12	26,98		27,21
30.03	40	28,32		29,98	28,12	27,06		27,65	27,51		26,98
31.03	41	28,17		30,03	28,52	26,11		27,6	27,11		26,71
01.04	42	28,79		30,2	29,04	25,34		27,09	25,25		27,76
02.04	43	28,84		30,64	29,16	26,28		27,64	24,85		28,84
03.04	44	28,66		30,58	27,84	25,93		26,15	/		27,78
05.04	45	28,99		30,32	28,94	26,35		25,7			28,26
05.04	46	30,04		30,61	28,76	25,76		23,24			27,61
06.04	47	31,04		30,28	28,47	25,66		21,85			27,32
07.04	48	31,16		30,5	29,94	25,94		/			27,7
08.04	49	31,86		30,94	28,88	26,31					27,51
09.04	50	32,32		31,1	28,96	26,52					27,01
10.04	51	31,64		31,15	29,44	26,18					27,79
11.04	56	31,10		31,34	29,84	25,92					27,81
12.04	57	31,72		32,42	29,2	26,77					28,41
13.04	58	31,04		31,5	29,04	26,02					27,58
14.04	59	30,74		31,66	28,81	26,25					27,53
15.04	60	31,17		31,45	28,98	26,21					27,48
16.04	61	31,48		31,77	29,67	26,51					27,39
17.04	62	30,07		31,74	28,91	27,74					27,94
18.04	63	30,59		31,07	28,72	26,98					27,36
19.04	64	30,36		31,21	29,37	26,97					27,62
20.04	65	30,48		30,49	28,16	26,57					27,04

21.04	66	30,37		30,38	28,31	26,22					26,68
22.04	67	29,73		30,73	28,1	25,76					26,74
23.04	68	30,45		30,4	28,34	26,04					24,77
24.04	69	31,42		31,40	29,94	26,40					23,40
25.04	70	30,33		30,26	28,3	26,5					24,2
26.04	71	30,84		/	28,4	26,15					24,24
27.04	72	30,49			28,29	26,62					24,62

Tiere, die frühzeitig aufgrund von Auffälligkeiten beendet wurden, sind mit „/“ gekennzeichnet

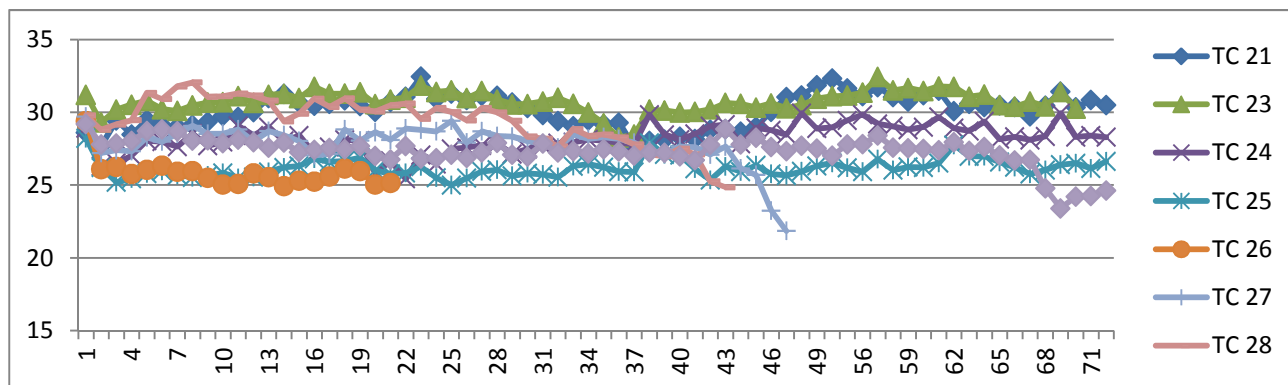


Abbildung 41: Diagrammförmiger Gewichtsverlauf TC 3

10 Verzeichnisse

10.1 Literaturverzeichnis

[Artikel].

Adamson Cory, Kanu, Okezie O., Mehta, Ankit, Chunhui, Di BS, Lin, Ningjing, Mattox, Austin K., BS, Bigner, Darell D. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going [Artikel] // Expert Opin Investing Drugs. - 2009. - Vol. 18, no 8, pp. 1061-1084.

Adamson Cory, Okezie O Kanu, Ankit Mehta Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. [Artikel]. - 2009. - pp. 1061-83.

Aime Silvio, Caravan, Peter Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition [Artikel] // J Magn Reson Imaging. - 2009. - Vol 30 (6), pp.: 1259-1267.

Al-Hajj Muhammead, Wicha, Max S., benito-Hernandez, Adalberto, Morrison, Sean, Clarke, Michael F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [Artikel] // National Academie Science. - 2003. - Vol 100, pp.: 3983-3988.

Annovazzi L., Mellai, M., Caldera, V., Valente, G., Schiffer, D. SOX2 Expression and Amplification in Gliomas and Glioma Cell Lines [Artikel] // Cancer Genomics & Proteomics. - 2011. - Vol. 8, No. 3, pp.: 139-147.

Beach T.G., Tago, H., Nagai, T., Kimura, H., McGeer, P.L., McGeer, E.G. Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation [Artikel] // Journal of Neuroscience Methods. - 1987. - Vol. 19, Issue 3, pp.: 183-192.

Beier D., Hau, P., Proescholdt, M. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. [Buch]. - [s.l.] : Cancer Research, 2007. - Bde. Vol. 67, pp. 4010-4015.

Beier D., Röhl, S., Pillai, D., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., gibel, B., Wischhusen, Jörg, Reifenberger, G., Hau, P., Beier, C.P. Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma [Artikel] // Cancer research. - 2008. - Vol. 68, pp.: 5706-15.

Berezovsky A.D., Poisson, L.M., Cherba, D., Webb, C.P., Transou, A.D., Lemke, N.W., Hong, X., Hasselbach, L.A., Irtenkauf, S.M., Mikkelsen, T., deCarvalho, A.C.

Sox2 Promotes Malignancy in Glioblastoma by Regulating Plasticity and Astrocytic Differentiation [Artikel] // Neoplasia. - 2014. - Vol. 16, Number 3, pp.: 193-206.

Bonnet Dominique, Dick, John E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [Artikel] // Nature. - 1997. - Vol.3, Number 7, pp.730-738.

Brantley Emily C., Nabors, Burton, Gillespie, G. Yancey Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. [Artikel] // Clinical Cancer Research. - 2008. - Vol. 14, Issue 15, pp.:4694-704.

Calabrese C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells [Artikel] // Cancer Cell. - 2007. - Vol 11, pp.: 69-82.

Carro M.S., Lim, W.K., Alvarez, M.J., Bollo, R.J., Zhao, X., Snyder, E., Sulman, E.P., Anne, S.L., Doetsch, F., Colman, H., Lasorella, A., Aldape, K., Califano, A., Lavarone, A. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain Tumors [Artikel] // Nature. - 2010. - Vol. 463, Issue 7279, pp.: 318-325.

Charles River Basic Research www.criver.com [Online]. - Charles River, 2014.

Cheng S.Y., Huang, H.J., Nagane, M., Wang, X.D.J., Shih, C.C., Arap, W., Huang, C.M., Cavenee, W.K. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor [Artikel] // Proc. Natl. Acad. Science USA. - 1996. - Vol. 93, 16, pp.: 8502-8507.

Chirasani S., Leukel, P., Gottfried, E., Hochrein, J., Stadler, K., Neumann, B., Oefner, P., Gronwald, W., Bogdahn, U., Hau, P., Kreutz, M., Grauer, O.M. Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model [Journal]. - 2012. - Vol. 132 (4), pp.: 843-53 : Bd. International Journal of Cancer.

Clark Paul A., Iida, Mari, Treisman, Daniel M., Kalluri, Haviryaji, Ezhilan, Sathyapriya, Zorniak, Michael, Wheeler, Deric L., Kuo, John S. Activation of Multiple ERBB Family Receptors Mediates Glioblastoma Cancer Stem-like Cell Resistance to EGFR-Targeted Inhibition [Artikel] // Neoplasia. - 2012. - Vol 14 (5), pp.: 420-428.

Clopper C.J., Pearson, E.S. The use of Confidence odr Fiducial Limits Illustrates in the Case of Binominal [Artikel] // Biometrika Trust. - 1934. - Vol. 26, pp.. 404-413.

Dickinson P. Intrakranielle Tumore bei Hunden [Artikel] // Veterinary focus. - 2014. - Vol 24, pp.: 2-10.

Dietzmann Knut DIETZMANN, KNUT. "Möglichkeiten und Bedeutung der Neuropathologie Möglichkeiten und Bedeutung der Neuropathologie für die Neurologie: Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis [Buchabschnitt]. - 2005.

Dimov Irena, Tasi'c, Desanka, Conic Irena, Stefanovic, Vladisav Glioblastoma Multiforme Stem Cells [Artikel] // The Scientific World Journal. - 2011. - Vol. 11, pp.: 930-958.

Doucette T.A., Kong, L-Y., Yang, Y., Ferguson, S.D., Yang, J., Wei, J., Qiao, W., Fuller, G.N., Bhat, K.P., Aldape, K., Priebe, W., Bögl, O., Heimberger, A.B., Rao, G. Signal transducer and activator of transcription 3 promotes angiogenesis and drives malignant progression in glioma [Artikel] // Neuro-Oncology. - 2012. - Vol. 14, Issue 9, pp.: 1136-1145.

Druckrey H., Ivankovic, S. Selective induction of carcinoma of the paranasal sinuses in rats with N,N'-Di-Nitrosopiperazine, Nitrosopiperidine, Nitrosomorpholine, Methylallyl-, Dimethyl- and Methylvinyl Nitrosamine [Buch]. - 1964. - Bde. Z Krebsforsch 66: 138-50.

DSMZ Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH [Artikel].

Ellis P., Fagan, B.M., Magness, S.t., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., Pevny, L. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. [Artikel] // Dev Neuroscience. - 2004. - Vol. 26, pp.: 148-65.

Esposito I. Kleef, J. Bischoff, S.C. Fuchser, I., Collecchi, P. iorio, M., Bevilacqua, G., buchler, M.W., Fries, H. The stem cell factor-c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer [Artikel] // Lab. Invest.. - 2002. - Vol. 82, pp.: 1481-1492.

Feiden S., Feiden, W. WHO classification of tumours of the CNS: revised edition of 2007 with critical comments on the typing und grading of common-type diffuse gliomas [Artikel] // Der Pathologe. - 2008. - vol. 29, pp. 411-21.

Feltbower RG, Picton, S., Bridges, L.R., Crooks, D.A., Glaser, A.W., McKinney, P.A. Epidemiology of central nervous system tumors in children and young adults (0-29 years), Yorkshire, United Kingdom. [Artikel] // Pediatric Hematology Oncology. - University of Leeds : [s.n.], 2004.

Galli Rosella, Binda, Elena, Orfanelli, Ugo Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from human Glioblastoma [Artikel] // Cancer Research. - 2004. - Vol 64, pp.: 7011-7021.

Gambarota Giulio, Leenders William In Vivo NMR Imaging: Characterization of tumor Vasculature in Mouse Brain by USPIO Contrast-Enhanced MRI [Buch]. - [s.l.] : Springer Science + Business Media, 2011. - Bd. Chapter 25.

Gangemi R.M.R., griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M.C., Malatesta, P., Ravetti, G.L., Zona, G.L., Daga, A., Corte, G. SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity [Artikel] // Stem Cells. - 2009. - Vol 27, pp.: 40-48.

Germano Isabelle, Swiss, Victoria, Casaccia, Patrizia Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? [Artikel] // Neuropharmacology. - 2010. - Vol 58, pp.: 903-910.

Gill Gary W. H&E staining: over sight and insights [Artikel] // Connection . - 2010. - 14, pp.: 104-114.

Guedel A.A. Inhalation anaesthesia: a fundamntal guide [Artikel] // New York: Macmillan. - 1951.

Hadjipanayis C., Meier, E. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy [Artikel]. - [s.l.] : Journal of molecular medicine, 2009. - pp. 363-374 : Bd. 87.

Hadjipanayis C., Meier, E. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy [Artikel] // Journal of molecular medicine. - 2009. - vol. 87, pp. 363-374.

Hegi ME., Diserens, AC, Gorila, T., Hamou, MF., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, JM., Hainfellner, JA., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, JE., Hau, P., Mirimanoff, RO., Cairncross, JG., Janzer, RC., Stupp, R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. [Artikel] // The New England Journal of Medicine. - 2005. - Vol. 352, pp.: 997-1003.

Henwood Anthony Microscopic Quality Control of Haematoxylin and Eosin - Kno your Histology [Buchabschnitt]. - Westmead 2145, Austria : [s.n.], 2010.

Hirato J., Nakazato, Y., Ogawa, A. Expression of non-glial intermediate filament proteins in gliomas [Artikel] // Clinical Neuropathology. - 1994. - Vol. 13(1), pp.: 1-11.

- Hopwood D.** Cell and tissue fixation [Buchabschnitt]. - United Kingdom : Department of Pathology, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, 1984.
- Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywel E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A.** Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro [Artikel] // *Glia*. - 2002. - 39 (3), pp.: 193-206.
- Ivarone Dr. Antonia** . - Columbia University, institute for Cancer Genetics : [s.n.], 2014.
- Jacob Kl.** Cerebrale Gliome bei Hunden [Artikel] // *Zentralblatt für Veterinärmedizin*. - 2010. - Vol. 6, Issue 10, pp. : 945-962.
- Jacques G., Cormac, O.** Central nervous system tumors [Artikel] // *Handbook Clinical Neurology*. - 2013. - Vol. 8, pp. 931-58.
- Kalluri R** EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like celss [Journal]. - 2009. - Vol. 119, pp.: 1417-1419.
- Kanazawa N., Tomiyasu, K., Ito, H., Saito, T., Kowa, H.** Optimal fixation for the detection of anti-neuronal antibody by immunohistochemistry in the paraneoplastic syndrome [Artikel] // *Rinsho Byori, The Japanese Journal of clinical pathology*. - 1996. - Vol. 44 (7), pp.: 640-6.
- Kasukurthi R., Brenner, MJ, Moore, AM, Moradzadeh, A, RAY, WZ, Santosa, KB, Mackinnon, SE, hunter, DA** Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration [Artikel] // *Journal Neuroscience Methods*. - 2009. - Vol. 184 (2), pp.: 303-309.
- Kelly J.J.P., Stechishin, O., Chojnacki, A., Lun, X., Sun, B., Senger, D.L., Forsyth, P., Auer, R.N., Dunn, J.F., Cairncross, J.G., Parney, I.F., Weiss, S.** Proliferation of Human Glioblastoma Stem Cells Occurs [Artikel] // *Cancer Stem Cells*. - 2009. - Vol 27, pp.: 1722-1733.
- Kleihues P.** Klassifikation, Grading und genetisches Profil der Gliome [Artikel] // *Onkologie*. - 2007. - vol. 5, pp. 5-9.
- Kleihues P., Sobin, L.** World Health Organization Classification of Tumors [Buch]. - [s.l.] : American cancer society, 2000.
- Lamberts R., Goldsmith, P.C.** Fixation, fine structure, and immunostaining of neuropeptides: perfusion versus immersion of the neuroendocrine hypothalamus [Artikel] // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. - 1986. - Vol. 34, No. 3, pp.: 389-398.

- Larson Erik W., Peterson, Halloran E., Fairbanks, Robert K., Lamoreaux, Wayne T., Machay, Alexander R., Call, Jason A., Demakas, John J., Cooke, Barton S., Lee, Christopher M.** Long- Term Survival and Improved Quality of Life following Multiple Repeat Gamma Knife Radiosurgeries for Recurrent Glioblastoma Multiforme: A Case Report and Review of Literature [Artikel] // Hindawi Publishing Corporation. - 2013.
- Leukel Petra** Die Rolle des Tumorstoffwechsels bei der Invasion maligner Gliome ins gesunde Parenchym [Buch]. - [s.l.] : Dr. Hut, 2012.
- Liu W., Zhang, S., Zhang, L., Cui, Q., Wang, J., Gui, T., Pang, Q.** A prognostic analysis of pediatric central nervous system small cell tumors: evaluation of EGFR family gene amplification and overexpression. [Artikel] // Diagnostic Pathology. - 2014. - Vol. 9, 132.
- Liu X., Bolteus, A.J., Balkin, D.M., Henschel, O., Bordey, A.** GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes [Artikel] // Glia. - 2006. - Vol. 54 (5), pp.: 394-410.
- Löscher Wolfgang, Ungemacht Fritz Rupert, Kroker, Reinhard** Pharmakotherapie bei Has- und Nutztieren [Buch]. - [s.l.] : Parey, 2006. - Bd. 7 Ausgabe.
- Louis D., Ohgaki, H., Wiestler, O. et al.** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. [Artikel] // Acta Neuropathologica. - 2007. - vol. 114, pp. 97-109.
- Louis D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K.** WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Fourth Edition [Buch]. - 2007. - Bde. Vol. 4, pp.: 33-48.
- Malatesta Paolo, Appolloni, Irene, Calzolari, Filippo** Radial glia and neural stem cells [Artikel] // Cell Tissue Res. - 2008. - Vol. 331, pp.: 165-178.
- Marsden Carolyn G., Wright, Mary Jo, Carrier, Latonya, Moroz, Krzysztof, Pochampally, Radhika, Rowan, Brian G.** A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies [Artikel] // BMC Cancer. - 2012. - Vol. 12.
- Mokry J, Clzkova, D., Ehrmann, F.J., Österreicher, J., Kolar, Z., English, D.** Nestin expression by newly formed human blood vessels [Artikel] // Stem cells Dev.. - 2004. - Vol. 13 (6), pp.: 658-664.
- Moskowitz Shaye I., Jin, Tao, Prayson, Richard A.** Role of MIB1 in predicting survival in Patients with glioblastomas [Artikel] // Journal of Neuro-Oncology. - 2006. - Vol. 76, pp.: 193-200.

- Nih L.R., Deroide, N., Lere-Dean, C., Lerouet, D., Soustrat, M., Levy, B., Silvestre, J.S., Merkulova-Rainon, T., Pocard, M., Margail, I., Kubis, N.** Neuroblast survival depends on mature vascular network formation after mouse stroke: role of endothelial and smooth muscle progenitor cell co-administration [Artikel] // European Journal of Neuroscience. - 2012. - Vol 35, Issue 8, pp.: 1208-1217.
- Nishikawa R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K., Huang, H.J.S.** A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity [Artikel] // Proc., Nat. Acad. Science. - 1994. - Vol. 91, 16, pp.: 7727-7731.
- Oertel J., von Buttlar, E., Schroeder, H.W., Gaab, M.R.** Prognosis of gliomas in the 1970s and today [Artikel] // Neurosurgery Focus. - 2005. - 18 (4).
- Ohgaki H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M.G., Lutolf, U.M., Kleihues, P.** Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study [Artikel] // Cancer Research. - 2004. - Vol. 64, pp.: 6892-6899.
- Ohgaki H., Kleihues, P.** Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. [Artikel] // Cancer science. - 2009. - vol. 100, pp. 2235-41.
- Ohgaki Hiroko, Kleihues, Paul** Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. [Artikel] // Cancer Science. - 2009. - vol. 100, pp 2235-41.
- Pantelouris E. M., Hair, J.** Thymus dysgenesis in nude (nu/nu) mice [Artikel] // J. Embryol. exp. Morph.. - 1970. - Vol. 24, 3, pp. 615-623.
- Piechaczek C.** CD 133 [Artikel] // J Biol regul homeost Agents. - 2001. - Vol 15, pp.: 102-102.
- Pillai Deepu R., Heidemann, R.M., Kumar, P., Shanbhag, N., Lanz, T., D., Michael, S., Sander, B., Beier, C. P., Weidner, n., Greenlee, M.W., Schuirer, G., Bogdahn, U., Schlachetzki, F.** Comprehensive Small Animal Imaging Strategies on a Clinical 3T Dedicated Head MR-Scanner; Adapted Methods and Sequence Protocols in CNS Pathologies [Artikel] // PLoS ONE. - 2011. - Vol 6, pp.:1-17.
- Puls Ralf, Hosten, Norbert** Ganzkörper-MRT-Screening [Buch]. - [s.l.] : Wissenschaftsverlag GmbH, 2010.
- Qiang L., Yang, Y., Ma, Y.J., Chen, F.H., Zhang, L.B., Liu, W., Qi, Q., Lu, N., Tao, L., Wang, X.T., You, Q.D., Guo, L.** Isolation and characterization of cancer stem like cells in

human glioblastoma cell lines [Artikel] // Cancer Letters. - 2009. - Vol 279, Issue 1, pp.: 13-21.

Rahaman S.O., Harbor, P.C., Chernova, O., Barnett, G.H., Vogelbaum, M.A., Haque, S.J. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. [Artikel] // Oncogene. - 2002. - Vol. 21, Issue 55, pp.: 8404-13.

Rao Jasti S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases [Artikel] // Nature reviews Cancer. - 2003. - Vol. 3, pp. 489-501.

Reifenberger G., Szymas, J., Wechsler, W. Differential expression of glial- and neuronal-associated antigens in human tumors of the central and peripheral nervous system [Artikel] // Acta Neuropathologica. - 1987. - Vol 74, pp.: 105-123.

Reis Rui M., Könü-Lebleblicioglu, Dilek, Lopes, Jose Manuel, Kleihues, Paul, Ohgaki, Hiroko Genetic Profile of Gliosarcomas [Artikel] // American Journal of Pathology. - 2000. - Vol. 156, No 2.

Reya Tannishtha, Morrison, Sean J., Clarke, Michael F., Weissman, Irving L. Stem cells, cancer and cancer Stem cells [Artikel] // Nature. - 2001. - vol. 414, pp. 105-111.

Reya Tannishtha, Morrison, Sean J., Clarke, Michael F., Weissman, Irving L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [Artikel] // Nature. - 2001. - Vol. 414, pp.105-111.

Riemenschneider M., Jeuken, J., Wesseling, P. et al Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. [Artikel] // Acta Neuropathologica. - 2010. - vol. 120, pp 567-84.

Sampetrean O., Saga, I., Nakanishi, M., Sugihar, E., Fukaya, R., Onishi, N., Osuka, S., Akahata, M., Kai, K., Sugimoto, H., Hirao, A., Saya, H. Invasion Precedes Tumor Mass Formation in a Malignant Brain Tumor Model of Genetically Modified Neural Stem Cells [Artikel] // Neoplasia. - 2011. - Vol 13, 9, pp.: 784-791.

Schakert G. Neurochirurgische Therapie malignen Gliome [Buch]. - 1998. - Bd. Onkologie.

Schiefer B., Dahme, E. Primäre Geschwülste des ZNS bei Tieren [Artikel] // Acta Neuropathologica. - 1962. - pp.: 202-212.

Schiffer D., Giordana, M.T., Mauro, A., Migheli, A., Germano, I., Giaccone, G. Immunohistochemical Demonstration of Vimentin in Human Cerebral Tumors [Artikel] // Acta Neuropathologica. - [s.l.] : Springer-Verlag, 1986. - Vol. 70, pp.: 209-219.

- Schiffer D., Mellai, M., Annovazzi, L., Caldera, V., Piazzzi, A., Denysenko, T., Melcarne, A.** Stem Cell Niches in Glioblastoma: A Neuropathological View [Artikel] // BioMed Research International. - 2014. - Vol. 2014, Article ID 725921.
- Schlegel Uwe, Veller, Michael, Westphal, Manfred** Neuroonkologische Therapie [Buch]. - [s.l.] : Kohlhammer, 2009. - Bd. 1 Auflage.
- Schneider R.** Tumors in Domestic Animals [Artikel]. - 1978.
- Sherry Maureen M., reeves, Andrew, Wu, Julian K., Cochran, brent H.** STAT3 Is Required for Proliferation and Maintenance of Multipotency in Glioblastoma Stem Cells [Artikel] // Stem Cells. - 2009. - Vol. 27, Issue 10, pp.: 2383-2392.
- Singh Sheila K., Clarke, Ian D., Terasaki, Mizuhiko, Bonn, Victoria E., Hawkins, Cynthia, Squire, Jeremy, Dirks, Peter B.** Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors [Artikel] // Cancer Research. - 2003. - Vol. 63, pp. 5821-5828.
- Singh Sheila K., Clarke, Ian D., Terasaki, Mizuhiko, Bonn, Victoria E., Hawkins, Cynthia, Squire, jeremy, Dirks, Peter B.** Identifikation of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors [Artikel] // Cancer research. - 2003. - Vol 63, pp.: 5821-5828.
- Singh Sheila K., Hawkins, Cynthia, Clarke, Ian D., Squire, Jeremy, Bayani, Jane, Hide, Takuichiro, Henkelmann, R. Mark, Cusimano, Michael D., Dirks, Peter B.** Identification of human brain tumor initiating cells [Artikel] // nature. - 2004. - Vol. 432, pp. 396-401.
- Song R.B., Vite, C.H., Bradley, C.W.** Postmortem evaluation of 435 cases of intracranial neoplasia in dogs and relationship of neoplasm with breed, age and body weight [Artikel] // J Vet Intern Med. - 2013. - Vol 27, pp.: 1143-1152.
- Stupp Rogger, Mason, Warren P., van den Bent, Martin J., Weller, Michael, Fisher, Barbara, Taphoorn, Martin** Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma [Artikel] // The New England Journal of Medicine. - 2005. - 352;10. pp.: 987-996.
- Sumeer Lai M.D., Lacroix, M., Tofilon, P., Fuller, G.N., Sawaya, R., Lang, F.F.** An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals [Artikel] // Jorunal of Neurosurgery. - 2000. - Vol. 92, pp.: 326-333.
- Tabatabai Ghazaleh, Weller, Michael** Glioblastoma stem cells [Artikel] // Cell and tissue research. - 2011. - Vol. 343, pp.: 459-465.
- Tonn J.C., Kreth, F.W., Goldbrunner, R., Meyer, B.** Hirntumoren und spinale Tumoren [Buch]. - [s.l.] : W.Zuckschwerdt Verlag, 2007. - Bde. 3. Auflage, p.4.

Uchida N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., Weissmann, I.L. Direct isolation of human central nervous system stem cells [Artikel] // Stem Cells. - 2000. - Vol. 97, pp.:14720-25.

Valent Peter, Bonnet, Dominique, De Maria, Ruggero, Lapidot, Tsvee, Copland Mhaira, E. Johnsen, Hans, Andreeff, Michael, Eaves, Connie Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the detail [Artikel] // Nature Reviews. - 2012. - Vol. 12, pp.: 767-775.

Van Meir Erwin G., Costas G. Hadjiipanyis, Andrew D. Norden, Hui-Kuo Shu, Patrick Y. Wen, Jeffrey J. Olson Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma [Artikel] // Cancer Journal for Clinicians. - 2010. - Vol 60, 3, pp. 166-185.

Van Meir Erwin G., Hadjiipanyis, Costas G., Norden, Andrew D., Shu, Hui-Kuo, Wen, Patrick Y., Olsen, Jeffrey J. Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma [Artikel] // A Cancer Journal for Clinicians. - 2010. - vol. 60, pp 166-193.

Velasco M.E., Dahl, D., Roessmann, U., Gambetti, P. immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms [Artikel] // Cancer. - 1980. - Vol. 45, pp.: 484-94.

Verhaak Roel G.W., Hoadley, Katherine A., Hayes, D.Neil An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of gliomastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1 [Artikel] // Cancer Cell. - 2010.

Vescovi A.L., Galli, R., Reynolds, B.A. Brain tumor stem cells [Artikel] // Nat Rev Cancer. - 2006. - pp. 425-36 : Bd. 6.

Veselska Renata, Kuglik, Petr, Cejpek, Pavel, Svachova, Hana, Neradil, Jakub, Loja, Tomas, Relichova, Jirina Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma [Artikel] // BioMed Central. - 2006. - Vol. 6:32, pp.: 1-12.

Viapiano M.S., S. Lawler Glioma Invasion: mechanisms and Therapeutic Challenges [Buch]. - [s.l.] : Springer Science & Business Media, 2009.

Virchow Rudolph Die krankhaften Geschwülste [Konferenz]. - Universität zu Berlin : [s.n.], 1863.

Vitiani Ricci, Lombardi, L., Piloizzi, D.G., Biffoni, E., Todaro, M., Peschle, M., De Maria, C. Identification and expression of human colon-cancer-initiating cells [Artikel] // Nature. - 2007. - Vol. 445, pp.: 111,115.

Watanabe K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas [Artikel] // Brain Pathology. - 1996. - Vol. 6 (3), pp.: 217-223.

Weller M. Interdisziplinäre S 2- Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters [Buch]. - [s.l.] : W. Zuckerwerdt Verlag, 2004.

Weller M., Tonn, J.C., Ernemann, U., Wiestler, O.D., Bamberg, M. Glioblastome, aktuelle Standarts bei der Diagnostik & Therapie [Artikel] // Best practice onkologie. - 2009.

Welsch Ulrich, Deller, Thomas Sobotta Lehrbuch Histologie [Buch]. - [s.l.] : Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 2011.

Wen Patrick Y., Kesari, Santosha Malignant gliomas in adults [Artikel] // New England Journal of Medicine. - 2008. - vol. 359, pp. 492-507.
www.cbtrus.org [Online].

Yamada S., Khankaldyyan, V., Bu, X., Suzuki, A., Gonzalez-Gomez, Takahashi, K., McComb, G., Laug, W.E. A method to accurately inject tumor cells into the caudate/putamen nuclei of the mouse brain [Artikel] // Tokai J Exp Clinical Medicin . - 2004. - Vol. 29, No 4, pp.: 167-173.

Yang Zeng-jie, Wechsler-Reya, robert J. Hit Èm Where They Live: Targeting the Cancer Stem Cell Niche [Artikel] // Cancer Cell. - 2007. - Vol. 11, pp.: 3-5.

Zatz Mayana uni-muenster.de [Online]. - 2014.

Zhou Rixin, Skalli Omar TGF-alpha differentially regulates GFAP, vimentin, and nestin gene expression in U-373 MG glioblastoma cells: correlation with cell shape and motility. [Artikel] // Experimental Cell Research. - 2000. - Vol. 254. Issue 2, pp.: 269-278.

10.2 Abkürzungsverzeichnis

GBM	Glioblastom multiforme
AKT	Proteinkinasen B Gruppe
AML	akuter myeloider Leukämie
ANA	Anti-Nuclei Antibody
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BTIC	brain tumor initiating cells, Hirntumor initiiierende Zellen
CD44	Cell surface Glykoprotein 44
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CSC	cancer stem cells, Tumorstammzellen
CT	Computertomographie
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothel Zellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECM	extrazelluläre Matrix
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FCS	Fetal calf Serum
GABRA1	Gamma Aminobutyric Acid A Rezeptor Alpha 1
GFAP	Glial fibrillary Acid Protein
IDH 1	Isocitratdehydrogenase 1
IHC	Immunhistochemie
IHC	Immunhistochemie
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Mib1	Mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1
MRT	Magnetresonanztomographie
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NaOH	Natronlauge
NEFL	Neurofilament light Polypeptid
NF1	Neurofibromin 1
NMRI nu/nu	Naval Medical Research Institute, homozygote
Mäuse	Nacktmäuse
NOD SCID	Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency
NPC	Neurale Progenitor Zellen
NSC	Neuronale Stammzelle
OLIG2	Oligodendrocyte transcription factor
p14ARF	p14 alternate reading frame, Tumorsuppressor Gen
p16INK4A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, multiple Tumorsuppressor 1
p21	cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGFRA	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd

PTEN	Phosphatase Tensin
RB	Retinoblastom Protein
RELB	Transkriptionsfaktor RELB
RYK	Rezeptor Tyrosine Kinase
SLC12A5	Potassium-chloride transporter member 5
SOX	SRY-related HMG box
SVZ	Subventrikularzone
SVZ	Subventrikularzone
SYT1	Synaptotagmin 1
TC	differenzierten Tumorzellen
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TIC	Tumor initiating cells
TP53	Tumorprotein 53
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrale Nervensystem

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für einige häufig verwendeten Antikörper in der IHC beim GBM	7
Tabelle 2: Medien und Zusätze	21
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 4: Antikörper	24
Tabelle 5: Puffer und Lösungen	25
Tabelle 6: Sedativa	25
Tabelle 7: Geräteliste	26
Tabelle 8: Probematerial humane GBM Zelllinien	27
Tabelle 9: Probenmaterial RAV 39 und RAV39-D	27
Tabelle 10: Probenmaterial NPC.....	27
Tabelle 11: Daten der konventionellen Tierhaltung.....	29
Tabelle 12: Zusammensetzung Kulturmedien.....	31
Tabelle 13: Annahme zur Berechnung der statistischen Wahrscheinlichkeit	34
Tabelle 14: Bewertungs-Score der Versuchstiere	35
Tabelle 15: Mischung für insgesamt 3ml Sedation, ausreichend für bis zu neun Tieren ...	37
Tabelle 16: Injektionsvolumen der Sedation nach Körpergewicht	38
Tabelle 18: Modifizierte Sequenzen für das GBM Maus Model nach (Pillai, 2011)	43
Tabelle 19: Ansatz für 1 Liter 4% PFA.....	44
Tabelle 20: Ansetzten der Hämalanlösung.....	51
Tabelle 21: Ansetzten der Eosinlösung.....	51
Tabelle 22: Färbeprotokoll HE.....	51
Tabelle 23: Allgemeines Protokoll für immunhistologische Färbungen nach DakoCytomation	53
Tabelle 24: Übersichtstabelle über Untersuchungsergebnisse der Vorversuche	54
Tabelle 26: Auswertungsschlüssel MRT.....	56
Tabelle 27: Tumortake nach bildgebenden Verfahren bei den Vorversuchen.....	57
Tabelle 28: Tumortake nach bildgebenden Verfahren bei den undifferenzierten Tumorzellen	60
Tabelle 29: Tumortake nach bildgebenden Verfahren bei den differenzierten Tumorzellen	63
Tabelle 30: Auswertung der HE Färbungen der Vorversuche	66
Tabelle 31: Auswertung der HE Färbungen RAV 39, BTIC	69

Tabelle 32: Auswertung der HE Färbungen RAV 39-d, TC.....	72
Tabelle 33: Marker positive Tumore nach Färbung der Vorversuchs Präparate	76
Tabelle 34: Untypischer Tumor	77
Tabelle 35: Zusammenfassung der exemplarischen immunologischen Färbungen der TC und BTIC.....	78
Tabelle 36: Statistische Berechnung G*Power	108
Tabelle 37: Gewichtsverlauf BTIC -Gruppe 1	109
Tabelle 38: Gewichtsverlauf BTIC-Gruppe II	111
Tabelle 39: Gewichtsverlauf BTIC-Gruppe III.....	113
Tabelle 40: Gewichtsverlauf TC-Gruppe I.....	115
Tabelle 41: Gewichtsverlauf TC-Gruppe II	117
Tabelle 42: Gewichtsverlauf TC-Gruppe III.....	119

10.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Entstehung des primären Glioblastoms mit dessen Subtypen durch verschiedene Mutationen und Entwicklung des sekundären Glioblastoms über die geringgradig, malignen Vorstufen (angepasst nach (Riemenschneider, 2010) und (Van Meir, 2010) mit freundlicher Genehmigung beider Autoren).....	6
Abbildung 2 Neurogenese und Tumorgenese, die neuronale, multipotente Stammzelle (NSC) als Ursprung für die differenzierten Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen: Entwicklung über die jeweiligen schon differenzierteren Progenitorzellen. Bei der Tumorgenese sind nach der Tumorstammzellhypothese, die NSC ebenfalls der Ausgangspunkt, dabei werden diese jedoch während der Differenzierung durch Mutation zu einer Tumor initiiierenden Zelle (TIC), eine weitere diskutierte Möglichkeit stellt die Dedifferenzierung dar. Dabei geht man davon aus, dass differenzierte Zellen sich durch Mutation zu weniger differenzierten TIC rückentwickeln, (angepasst nach (Singh, 2004) mit freundlicher Genehmigung der Autorin)	14
Abbildung 3 Koronare Schnittebene (MRT) durch das Gehirn einer Maus auf Höhe der gängigen Implantationsstelle.....	17
Abbildung 4 Versuchsaufbau der Vorversuche: RAV: BTIC, FB: NPC.....	32
Abbildung 5 Versuchsaufbau: Hauptversuch.....	33
Abbildung 6 Aufbau für die orthotope Implantation	36
Abbildung 7 links Stereotakt, rechts Maus im Stereotakt gelagert.....	39
Abbildung 8 Schematische Skizze eines Mausschädels zur Darstellung des Bregma.....	40
Abbildung 9 Schematische Darstellung der Injektionshilfe.....	42
Abbildung 10 Schematische Darstellung des Perfusionsaufbau	45
Abbildung 11 Narkosestadien nach Guedel AE (Quelle: gesundheit.de)	46
Abbildung 12 Schematische in situ Ansicht der Mäuse in situ während der kardialen Perfusion: Flußrichtung durch linken Ventrikel (1) über den gesamten Kreislauf bis zum rechten Auricula atrii (2).....	47
Abbildung 13 Aufbau, Einfrieren nach Johnson.....	49
Abbildung 14 Beispiel einer Maus (RAV 39) mit hochgradigen Tumorverdacht: großes hyperintenses Areal bei der T2 Wichtung, kaum sichtbare Veränderung bei der zweiten Sequenz (T1) und keine sichtbare Kontrastmittelanreicherung bei der letzten Messung ..	58
Abbildung 15 Beispiel einer Maus (RAV 20) mit hochgradigen Tumorverdacht: großes hyperintenses, inhomogenes Areal bei der T2 Wichtung, Verdrängung der linken	

Hemisphäre, sichtbare Veränderung bei der zweiten Sequenz (T1) und keine sichtbare Kontrastmittelanreicherung bei der letzten Messung.....	58
Abbildung 16 Beispiel einer Maus mit eindeutigem, hochgradigem Tumor: deutlich hyperintenser Bereich an der Implantationsstelle und positiver Kontrastmittelanreicherung mit T1 Wichtung. Gut sichtbar auch die Verstärkung des Signals von der ersten Kontrastmittelsequenz zur zweiten durch weitere Anreicherung (T1-K1: unmittelbar nach Kontrastmittelgabe, T1-K2: 8:36 Minuten nach Kontrastmittelgabe).	61
Abbildung 17 Beispiel einer Maus mit eindeutigem Tumor: deutlich hyperintenser Bereich an der Implantationsstelle mit T2 Wichtung, kaum sichtbar in T1 Wichtung und keiner deutlich Kontrastmittelanreicherung	62
Abbildung 18 Beispiel einer Maus ohne sichtbare Veränderungen intrazerebral, sichtbarem Kontrastmittel intravasal und einem sichtbaren Einstichkanal von der Implantation.....	64
Abbildung 19 Beispiel einer Maus mit scheinbar soliden Veränderungen im Bereich des Kortex, sichtbarem Kontrastmittel intravasal.....	65
Abbildung 20 HE Färbung mit gut sichtbarer Implantationsstelle: keine auffällige Zellen	67
Abbildung 21 HE Färbung, RAV 39: deutliche nekrotische Areale, hoher Chromatin Gehalt (Mitoserate), gut sichtbar im Randbereich die fehlende Kapselbildung	67
Abbildung 22 HE Färbung eines ausgeprägten Tumors post Implantation (RAV 20): atypische Tumor nach BTIC Implantation. Nach histopathologischer Einordnung: ungewöhnlicher, multilineärer Tumor.....	67
Abbildung 23 HE-Färbung mit deutlichen Tumorbefund (RAV 20): gut sichtbarer stark erhöhter Chromatin Gehalt (Mitoserate) mit kleinen nekrotischen Arealen, als Anzeichen für einen malignen Prozess, im Gegensatz zu RAV 39 mit teilweise mit spindelförmigen Arealen	68
Abbildung 24 CSC 4, HE Übersicht, positiver Tumorbefund	69
Abbildung 25 HE Färbung post Implantation von humanen BTICs: Färbung von einem GBM post Implantation (BTIC 14), gut sichtbar die Verteilung und Wanderung der Zellen entlang des Balkens, die hohe Mitoserate und atypischen Zellen mit teils perivaskulären Zellen.....	70
Abbildung 26 HE Färbungen von BTIC 1: positiver Befund direkt an der Implantationsstelle, deutlich kleinerer Tumor wie bei den anderen Tieren	70

Abbildung 27 HE Färbung von einem GBM post Implantation von humanen BTIC (BTIC 3): gut sichtbar die Verteilung und Wanderung der Zellen entlang des Balkens, die hohe Mitoserate und atypischen Zellen	71
Abbildung 28 HE Färbung BTIC 12: solider Tumor im Bereich des Cortex an der Injektionsstelle	71
Abbildung 29 HE Färbung von einer Maus (TC 2) mit positiven Befund: gut sichtbar die wenigen, im Gegensatz zu den obigen Tumoren eher verstreut liegenden Zellen.....	73
Abbildung 30 HE Färbung von einer Maus (TC 16) mit positiven Befund: auch hier gut sichtbare, einzelne Tumorzellen mit scheinbar geringerer mitotischer Aktivität wie die im ersten Teil implantierten Tumor initiiierenden (CSC) Zellen	73
Abbildung 31 Vergleich der Tumordetektion im MRT in Bezug auf die positiv und negativ erkannten Tiere in der Histologie	75
Abbildung 32 IHC des atypischen Tumors: RAV 20, BTM 20.....	77
Abbildung 33 RAV 39, positive SOX 2 Färbung	79
Abbildung 34 RAV 39, positive GFAP Färbung	79
Abbildung 35 RAV 39, positiver Nestin Färbung.....	79
Abbildung 36 RAV 39, hochgradig, positive Mib1 Färbung mit gut sichtbaren tumorösen Zellen die.....	80
Abbildung 37 RAV 39, deutliche Detektion von ANA intratumoral	80
Abbildung 38 Diagrammförmiger Gewichtsverlauf: BTIC I.....	110
Abbildung 39 Diagrammförmiger Gewichtsverlauf: BTIC II	112
Abbildung 40 Diagrammförmiger Gewichtsverlauf: BTIC III	114
Abbildung 41 Diagrammförmiger Gewichtsverlauf: TC I.....	117
Abbildung 42 Diagrammförmiger Gewichtsverlauf: TC II	119
Abbildung 43 Diagrammförmiger Gewichtsverlauf: TC 3	121

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Peter Hau für die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl, die Bereitstellung des Themas sowie seiner Zeit, seiner Geduld und sein beständigem Interesse.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Kaspar Matiasek für die konstruktive Kritik, die Begutachtung und die Bereitschaft, diese Arbeit an der Tiermedizinischen Fakultät einzureichen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei:

- Herrn Professor Riemenschneider und dem gesamten Team der Neuropathologie, Regensburg, darunter vor allem Dr. Saida Zoubaa und Frau Maria Hirblinger
- Frau Dr. Arabel Vollmann-Zwerenz für ihre unermüdliche Geduld mit mir als „Nicht-Wissenschaftlerin“, ihre hervorragende wissenschaftliche Anleitung, ihre fachlichen Anregungen und für ihre Durchsicht meiner Arbeit
- Herrn Professor Dr. Ulrich Bogdahn für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Neurologie durchführen zu können
- Herrn Dr. Deepu Pillai für die anfängliche Hilfe bei den bildgebenden Verfahren
- Herrn Dr. Paul Sander für ihre Mithilfe beim MRT
- Frau Eva-Maria Störr für das Einbringen ihrer fachlichen Kompetenz, den immer Interessanten Gesprächen während der Versuche und ihrer jederzeit hilfsbereiten Art
- Frau Birgit Jachnik für ihre Hilfe bei allen Fragen rund um das Labor
- Frau Ina Weig-Meckl für ihre unermüdliche Unterstützung am Mikrotom
- Frau Verena Gawrisch dafür, dass Sie immer ein offenes Ohr hatte, danke auch für ihre großartige Hilfe und für die gemeinsamen, privaten Stunden
- Frau Sylvia Möckel und allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfe und für das stets angenehme Arbeitsklima
- Frau Dr. Anna Schwarz und Herrn Dr. Christian Fasold für die viele Geduld bei technischen Fragen, ihre Motivation und für ihre Unterstützung
- Meiner ganzen Familie für das mir stets entgegen gebrachte Verständnis und ihre Unterstützung und dafür, dass sie jederzeit für mich da ist
- Meiner Oma für das Dach über dem Kopf und für die gute Verpflegung, insbesondere während der letzten Phase
- Meinem Freund Christian Feige dafür, dass er mich jederzeit unterstützte